

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig – Maximilians – Universität München

Vorstand: Prof. Dr. R. Stolla

Angefertigt unter der Leitung von

Prof. Dr. J. Braun

**Assistierte Reproduktion beim Pferd**  
**- Eine Literaturstudie -**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig – Maximilians – Universität München

von

Nina Kölle  
aus Heilbronn

München 2003

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig – Maximilians – Universität München

Dekan: Univ. – Prof. Dr. R. Stolla

Referent: Univ. – Prof. Dr. J. Braun

Korreferent: Univ. – Prof. Dr. H. Gerhards

Tag der Promotion: 18. Juli 2003

*Meinen Eltern gewidmet*

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Auslösung von Ovulationen und Superovulationen	2
2.1	Extrakt aus Pferdehypophysen	3
2.2	Follikelstimulierendes Hormon (FSH)	6
2.3	Human Menopausal Gonadotropin (HMG)	7
2.4	Aktive und passive Immunisierung gegen Inhibin	8
2.5	Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH)	9
2.6	Lichtprogramm	9
2.7	Schlußfolgerung	9
3	Synchronisation der Spender- und Empfängerstuten	11
3.1	Synchronisation des Östrus	12
3.1.1	Prostaglandin F <sub>2α</sub> und dessen Analoga	12
3.1.2	Steroidhormone (Progesteron und Östradiol)	13
3.1.3	Allyl-Trenbolon	14
3.2	Induktion der Ovulation	15
3.2.1	Humanes Choriongonadotropin (hCG)	15
3.2.2	Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH)	16
3.3	Ovariectomierte, hormonbehandelte Empfängerstuten	19
3.4	Schlußfolgerung	26
4	Embryonengewinnung	27
4.1	Auswahl der Spenderstute	27
4.2	Vorbereitung der Spenderstute	28
4.3	Techniken der Embryonengewinnung	29
4.3.1	Chirurgische Embryonengewinnung	29
4.3.2	Nicht-chirurgische Embryonengewinnung	30
4.4	Faktoren, die die Embryonengewinnung beeinflussen	34
4.5	Frühe Embryonalentwicklung und morphologische Beurteilung der Embryonen	35
4.5.1	Die Oozyte	36
4.5.2	Embryonalentwicklung im Eileiter (Tag 0 bis 5 post ovulationem)	36
4.5.3	Frühe Embryonalentwicklung im Uterus (Tag 6 bis 9 post ovulationem)	37

4.5.4	Beurteilung der Embryonen	39
4.5.5	Unbefruchtete Oozyten	40
4.6	Schlußfolgerung	40
5	Transfer von Embryonen	42
5.1	Auswahl und Vorbereitung der Empfängerstuten	42
5.2	Zum Transfer von Embryonen verwendete Techniken	44
5.2.1	Chirurgischer Transfer von Embryonen	44
5.2.2	Nicht-chirurgischer Transfer von Embryonen	46
5.3	Trächtigkeitsunterstützende Maßnahmen nach dem Transfer	47
5.4	Faktoren, die die Trächtigkeitsrate beeinflussen	48
5.4.1	Jahreszeit	48
5.4.2	Transfermethode	49
5.4.3	Synchronität zwischen Spender und Empfänger	50
5.4.4	Alter der Spenderstute	50
5.4.5	Qualität der Embryonen	50
5.5	Schlußfolgerung	51
6	Kühlung und Transport von Embryonen	52
6.1	Kulturmedien und Lagerungsbedingungen	52
6.1.1	Dulbecco's phosphate buffered saline (dPBS)	52
6.1.2	Ham's F 10	53
6.2	Morphologische Veränderungen der Embryonen nach Kühlung und Lagerung	55
6.3	Trächtigkeitsraten nach Kühlung und Lagerung in Ham's F 10	55
6.4	Schlußfolgerung	58
7	Kryokonservierung von Embryonen	59
7.1	Prinzipien der Kryokonservierung	59
7.1.1	Konventionelle Kryokonservierung	59
7.1.2	Vitrifikation	61
7.2	Durchführung der Kryokonservierung	62
7.2.1	Alter und Größe der Embryonen	62
7.2.2	Behältnisse zur Kryokonservierung	64
7.2.3	Kryoprotektiva und Einfriermedien	65
7.2.4	Auftauprozess	67
7.3	Morphologische Veränderungen nach der Kryokonservierung	68

7.4	Schlußfolgerung	68
8	Mikrochirurgische Eingriffe an Embryonen und Kerntransfer	69
8.1	Produktion monozygoter Zwillinge durch Mikromanipulation	69
8.2	Sexing von Embryonen	72
8.3	Kerntransfer (Klonen)	74
8.4	Schlußfolgerung	76
9	Oozytengewinnung	77
9.1	Chirurgische Oozytengewinnung	77
9.2	Follikelpunktion von der Flanke aus	78
9.3	Transvaginale Follikelpunktion	82
9.4	Oozytengewinnung aus isolierten Ovarien (Schlachthofovarien)	90
9.5	Morphologie der Oozyten	99
9.6	Schlußfolgerung	100
10	Oozytenreifung <i>in vitro</i>	102
10.1	Aufbewahrung der Oozyten bis zum Einsetzen in das Reifungsmedium	102
10.2	Beurteilung der Oozytenreifung	102
10.2.1	Beurteilung der Kernreifung	103
10.2.2	Beurteilung der zytoplasmatischen Reifung	104
10.2.3	Beurteilung der Cumuluszellexpansion	105
10.3	Reifungsmedien	105
10.4	Zugesetzte Serumkomponenten	108
10.5	Zugesetzte Hormone	109
10.6	Zusatz somatischer Zellen	110
10.7	Sonstige zugesetzte Komponenten	112
10.8	Kulturbedingungen	114
10.9	Kulturzeit	115
10.10	Faktoren, welche die Oozytenreifung <i>in vitro</i> beeinflussen	116
10.11	Schlußfolgerung	118
11	Transfer von unbefruchteten Oozyten	119
11.1	Chirurgischer Transfer in den Eileiter	119
11.1.1	Empfängerstuten	119
11.1.2	Besamung	121
11.1.3	Technik	122

11.1.4	Trächtigkeits- bzw. Embryoentwicklungsraten	123
11.2	Gamete Intrafallopian Tube Transfer (GIFT)	124
11.3	Intrafollikulärer Transfer von Oozyten	126
11.4	Schlußfolgerung	128
12	Kryokonservierung von Oozyten	129
12.1	Konventionelle Kryokonservierung	129
12.2	Vitrifikation	130
12.3	Schlußfolgerung	133
13	<i>In vitro</i> -Fertilisation	134
13.1	Standardtechniken der <i>in vitro</i> -Fertilisation	134
13.2	Assistierte Fertilisationstechniken	136
13.3	Schlußfolgerung	143
14	<i>In vitro</i> -Kultur von Embryonen	144
14.1	<i>In vitro</i> -Kultur von <i>in vivo</i> produzierten Embryonen	144
14.2	<i>In vitro</i> -Kultur von <i>in vitro</i> produzierten Embryonen	146
14.3	Schlußfolgerung	148
15	Zusammenfassung	149
16	Summary	151
17	Anhang	153
18	Literaturverzeichnis	164

## 1. Einleitung

In der Rinderzucht und -produktion hat sich der Embryotransfer zusammen mit den assoziierten Biotechniken (Embryokonservierung, *in vitro*-Produktion von Embryonen) in den letzten dreißig Jahren zu einer etablierten Technologie entwickelt, die fester Bestandteil der modernen Tierzucht ist. Die Bedeutung des Einsatzes von Biotechniken in der Pferdezucht erfährt dagegen eine andere Gewichtung. Auch beim Pferd hat der Einsatz des Embryotransfers und die Entwicklung der Biotechniken in den letzten beiden Jahrzehnten stetig zugenommen. Da die equine Reproduktionsphysiologie jedoch verschiedene Besonderheiten aufweist, sind die anfallenden Kosten für die biotechnischen Programme entsprechend hoch. Dies wird jedoch ausgeglichen durch einen unter Umständen sehr hohen materiellen Wert des Einzeltieres. Auch die emotionale Bedeutung eines Einzeltieres für den Besitzer kann eine Rolle spielen. Indikationen für den Einsatz der assistierten Reproduktion beim Pferd sind zum Beispiel die Produktion von Nachkommen alter und / oder subfertiler Stuten. In den letzten Jahren wurden große Anstrengungen unternommen, um zusätzlich zur Möglichkeit des Embryotransfers entsprechend der Situation beim Rind die *in vitro*-Produktion von Embryonen zu etablieren. Ziel dieser Arbeit war es, den derzeitigen Stand der Forschung auf dem Gebiet der assistierten Reproduktion beim Pferd darzustellen und kritisch zu bewerten.



## 2. Auslösung von Ovulationen und Superovulationen

Physiologischerweise gelangt bei Stuten meist nur ein Follikel zur Ovulation. Die Häufigkeit von natürlichen Doppelovulationen bei der Stute variiert zwischen 4 und 44 % (Stabenfeldt et al. 1972; Ginther 1979). Bei Stuten mit Doppelovulationen liegt der Anteil an Zwillingssträchtigkeiten bei 42,7 %. Dreifachovulationen kommen nur sehr selten vor (ca. 2 %), nur bei 0,96 % dieser Stuten entwickelt sich eine Drillingsträchtigkeit (Newcombe 1995). 1995 veröffentlichten MEADOWS und Mitarbeiter den ersten Fall monozygoter Drillinge bei der Stute (Meadows et al. 1995). Die große Mehrzahl der Zwillingssträchtigkeiten sind dizygot. Dabei scheinen asynchrone Doppelovulationen häufiger zu einer Mehrlingsträchtigkeit zu führen als synchrone (Irvine 1983; Meadows et al. 1995). Beeinflusst wird die Häufigkeit von Doppelovulationen durch die Rasse, die Jahreszeit, den Reproduktionszustand und die genetische Prädisposition (Hughes et al. 1972; Ginther et al. 1982). Bei Vollblut- und Warmblutstuten kommen Mehrfachovulationen am häufigsten vor, bei Quarterhorse- und Ponystuten eher selten (Ginther et al. 1982; Squires et al. 1987). Untersuchungen an Vollblutstuten zeigten, daß es keine Beziehung zwischen der Konzentration an Gonadotropinen im Blut und der Anzahl an Ovulationen gibt. Deshalb wird vermutet, daß die Ovarien von Stuten mit häufigen Mehrfachovulationen empfindlicher gegenüber Gonadotropinen reagieren. Diese erhöhte Empfindlichkeit könnte genetischen Ursprungs sein (Urwin und Allen 1983).

Durch die medikamentelle Auslösung von Mehrfachovulationen könnte die Effizienz des Embryotransfers bei der Stute erheblich verbessert werden, da pro Stute mehr als ein lebensfähiger Embryo gewonnen werden könnte. Auch bei subfertilen Stuten könnte eventuell die Konzeptionsrate durch die Bereitstellung von mehreren Eizellen zur Befruchtung erhöht werden. Bei einigen unserer Haussäugetiere wie z.B. Rind und Schwein ist die Auslösung von Superovulationen durch Hormonbehandlung mit follikelstimulierendem Hormon (FSH) oder equinem Choriongonadotropin (eCG) möglich. Diese Möglichkeit besteht bei der Stute leider nur begrenzt oder gar nicht. Erste Versuche zur Auslösung von Superovulationen durch exogene eCG-Gabe durch DAY 1939/40 scheiterten (Day 1939; Day 1940). Die scheinbare Resistenz der Gonaden gegenüber eCG beruht wahrscheinlich darauf, daß es an die FSH-Rezeptoren nicht gebunden wird und eine zehnfach geringere Affinität zu LH-Rezeptoren aufweist als das homologe Gonadotropin (Steward und Allen 1979). Im folgenden werden Versuche mit Extrakten aus Pferdehypophysen, follikelstimulierendem Hormon (FSH),

Human Menopausal Gonadotropin (HMG), Inhibin, Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) und Lichtprogrammen zur Auslösung von Ovulationen und Superovulationen besprochen.

## **2.1 Extrakt aus Pferdehypophysen**

Der erste erfolgreiche Versuch zur Auslösung mehrerer Ovulationen wurde 1974 veröffentlicht (Douglas et al. 1974). Saisonal anovulatorischen Stuten wurde unbehandelter oder gereinigter Extrakt aus Pferdehypophysen (Equine pituitary extract, EPE) über 14 Tage zweimal täglich in einer Gesamtdosis entsprechend 6,6 IU NIH-FSH-S1 / kg Körpergewicht (KGW) injiziert. 87 % der Stuten ovulierten und 58 % dieser Stuten hatten zwei oder mehr Ovulationen. Weitere Experimente zeigten, daß die minimale Dosis bei 0,824 IU NIH-FSH-S1 / kg KGW liegen muß. Auch durch die einmal tägliche Injektion von unbehandeltem EPE über 14 Tage, in einer Gesamtdosis entsprechend 3,3 IU NIH-FSH-S1 / kg KGW, konnte eine Ovulation bei allen elf behandelten anovulatorischen Stuten ausgelöst werden. Acht der Stuten zeigten mehr als eine Ovulation, die Ovulationsrate lag bei 1,6 (Lapin und Ginther 1977). Durch die zusätzliche Behandlung mit 2000 IU hCG (humanes Choriongonadotropin) am Tag 13 konnte das Intervall zwischen Beginn der Behandlung und Ovulation von durchschnittlich 17,4 Tagen um ca. zwei Tage verkürzt werden. Desweiteren konnten dieselben Autoren durch Behandlung von Stuten im Zyklus mit einer Gesamtdosis von 2 IU NIH-FSH-S1 / kg KGW EPE über sechs Tage eine Steigerung der Ovulationsrate auf 1,7 gegenüber 1,0 der Kontrollgruppe erreichen.

Bei Stuten im Zyklus konnte die Ovulationsrate durch Behandlung mit 750 Einheiten EPE an den Tagen 15 bis 19 post ovulationem auf durchschnittlich 3 erhöht werden, während dieselbe Behandlung an den Tagen 19 bis 23 mit durchschnittlich 1,3 Ovulationen deutlich schlechtere Ergebnisse zeigte (Woods und Ginther 1983). Ein Teil der Stuten, welche EPE an den Tagen 15 bis 19 post ovulationem (p.o.) erhielten, wurden am Tag 20 zusätzlich mit 3300 IU hCG behandelt. Bei dieser Gruppe fanden alle Ovulationen am selben Tag statt, während sie bei nicht mit hCG-behandelten Tieren auf drei bis vier Tage verteilt waren. Zudem zeigten hCG-behandelte Stuten eine höhere Ovulationsrate gegenüber jenen, die allein EPE erhielten ( $4,9 \pm 0,6$  gegenüber  $3,6 \pm 0,4$ ). Obwohl durch die Erhöhung der Ovulationsrate die Anzahl der zu gewinnenden Embryonen pro Spenderstute deutlich anstieg ( $2,9 \pm 0,7$  gegenüber  $0,9 \pm 0,1$ ) und dadurch auch die Anzahl der Trächtigkeiten bei Empfängerstuten pro Spender, stellten

dieselben Untersucher fest, daß die Lebensfähigkeit von sieben Tage alten Embryonen aus Superovulationen geringer war als jene aus Einzelovulationen (Woods und Ginther 1984). Die Trächtigkeitsrate am Tag 49 betrug nach dem Transfer von Embryonen aus der Kontrollgruppe 50 %, während sie für die Spender mit induzierten Mehrfachovulationen nur bei 33 % lag. Diese Ergebnisse konnten durch weitere Experimente jedoch nicht bestätigt werden (Squires et al. 1987). Es wurde kein Unterschied in der Lebensfähigkeit von sieben Tage alten Embryonen aus spontanen Einfach- gegenüber Doppelovulationen, gemessen an der Trächtigkeitsrate am Tag 50, beobachtet. In einem weiteren Versuch wurden Embryonen von EPE behandelten Stuten sowie von einer unbehandelten Kontrollgruppe am Tag 6 oder 8 gewonnen. Die Embryonen aus Mehrfachovulationen waren mit einer Trächtigkeitsrate von 39 % genauso entwicklungsfähig wie diejenigen aus Einzelovulationen (Trächtigkeitsrate 38 %). Auch gab es keinen signifikanten Unterschied in der Trächtigkeitsrate zwischen den am Tag 8 gewonnenen Embryonen (42 %) und jenen von Tag 6 (37 %).

Die Behandlung mit EPE induziert offenbar Superovulationen, indem Follikel, die ansonsten nicht zur Ovulation auserwählt würden, stimuliert werden. Experimente haben gezeigt, daß durch EPE-Gabe eine höhere Ovulationsrate ausgelöst wird, wenn die Differenz zwischen den Durchmessern der beiden größten Follikel klein ist (Woods und Ginther 1985). Im Verlauf eines Zyklus wachsen immer mehrere Follikel heran, diese sogenannte Kohorte wird ca. 10 bis 14 Tage vor der Ovulation bestimmt (Ginther 1979; Driancourt und Palmer 1984). Aus diesen wird der ovulatorische Follikel ungefähr sechs bis sieben Tage vor der Ovulation ausgewählt. Die anderen Follikel beginnen zu diesem Zeitpunkt mit der Rückbildung (Pierson und Ginther 1987). Eine Stimulation ist demnach nur dann möglich, wenn die Verabreichung von EPE vor dem Beginn der Rückbildung erfolgt. Der Durchmesser des größten Follikels beträgt zu diesem Zeitpunkt zwischen 15 und 25 mm (Pierson und Ginther 1990).

Es wurde auch der Versuch unternommen, die Anzahl an Superovulationen durch die Gabe einer Kombination von EPE und porcinem Wachstumshormon (pGH) zu erhöhen (Hofferer et al. 1991). Zunächst wurde der Zyklus der Stuten durch die Plazierung eines intravaginalen Schwammes mit 0,5 g Allyl-Trembolone plus 50 mg Östradiolbenzoat über sieben Tage reguliert. Nach Entfernung des Schwammes wurde den Stuten entweder nur 25 mg EPE oder 25 mg EPE plus 0,25 mg pGH i.m. einmal täglich bis zur Ovulation verabreicht. Die Ovulationsrate war in beiden Gruppen jedoch praktisch gleich ( $2,2 \pm 0,4$  gegenüber  $2,3 \pm 0,4$ ). Somit hatte die zusätzliche Gabe von pGH keinen Einfluß auf die Anzahl der Ovulationen. In diesen Untersuchungen sollte auch der folgende Zyklus wieder zur Auslösung

einer Superovulation genutzt werden. Die Stuten wurden in zwei Gruppen unterteilt: Gruppe eins wurde ohne Unterbrechung weiterhin 25 mg EPE täglich verabreicht, Gruppe zwei wurde erst nach siebentägiger Pause weiter behandelt, ebenfalls mit 25 mg EPE täglich. Dieser Versuch zeigte, daß bei einer Behandlung über zwei Zyklen eine Unterbrechung der EPE Behandlung über sieben Tage nach den ersten Ovulationen nicht notwendig ist, um eine zweite Welle von Mehrfachovulationen zu erhalten. Die Unterbrechung der EPE-Applikation förderte jedoch deren Synchronisation.

In einer anderen Untersuchung wurde festgestellt, daß die Stimulation mit 25 mg EPE nach induzierter Luteolyse ab Tag 5 post ovulationem erfolgreicher war als ab Tag 12 post ovulationem (2,9 Ovulationen gegenüber 1,1) (Dippert et al. 1992). Die Ovulationsrate bei Behandlung ab Tag 12 p.o. konnte jedoch durch zusätzliche Gabe von 3,3 mg GnRH auf 1,8 erhöht werden. GnRH scheint also die Reaktion auf die EPE-Behandlung zu verbessern. Die Embryogewinnungsrate betrug 1,2 (Tag 5), 1,0 (Tag 12) und 0,9 (GnRH) und zeigte auch gegenüber der Kontrollgruppe (0,9) keine wesentlichen Vorteile.

Die erste erfolgreiche Auslösung von Mehrfachovulationen bei der Stute erfolgte durch die zweimal tägliche Injektion von EPE (Douglas et al. 1974). Alle darauffolgenden Experimente folgten dem Protokoll der einmal täglichen Applikation in geringerer Gesamtdosis. Bei einem Vergleich dieser beiden Methoden konnte festgestellt werden, daß die zweimal tägliche Injektion einer hohen Dosis EPE das Follikelwachstum, die Ovulationsrate und die Embryogewinnungsrate gegenüber der einmal täglichen Standardbehandlung deutlich erhöht (Alvarenga et al. 2001). Stuten in Gruppe 1 erhielten 25 mg EPE einmal täglich, Stuten in Gruppe 2 dieselbe Dosis zweimal täglich. Die Behandlung wurde solange fortgeführt, bis mindestens die Hälfte der Follikel mit einer Größe über 30 mm auf die Größe von 35 mm angewachsen war. Die Behandlungszeit lag bei beiden Gruppen bei durchschnittlich 6,6 Tagen. Zu diesem Zeitpunkt erhielten die Stuten 2500 IU hCG. Die Ovulationsrate lag in Gruppe 1 bei durchschnittlich  $2,4 \pm 1,8$ , in Gruppe 2 bei durchschnittlich  $7,1 \pm 5,1$ . Die Embryogewinnungsrate lag in Gruppe 1 bei  $1,6 \pm 1,0$  (68 %), in Gruppe 2 bei  $3,5 \pm 1,8$  (49 %). Ein Grund für die erhöhte Ovulationsrate könnte die Aufrechterhaltung der FSH-Konzentration bei zweimal täglicher EPE-Behandlung sein. Auch bei Rindern wird FSH zur Auslösung von Superovulationen zweimal täglich verabreicht. Eine weiterer Grund könnte die Erhöhung der Gesamtdosis auf 50 mg EPE täglich sein. Allerdings konnte die Verabreichung von 40 mg EPE einmal täglich die Ovulationsrate nicht entsprechend erhöhen (3,6) (Dippert et al. 1994). Auffallend ist, daß die

Embryogewinnungsrate pro Ovulation mit steigender Ovulationsrate abnimmt. Für dieses Phänomen könnte es unterschiedliche Ursachen geben. Zum einen wird vermutet, daß die Fimbrien nicht in der Lage sind, alle ovulierten Oozyten in den Eileiter weiterzuleiten (Elsden und Seidel 1985). Eine weitere Möglichkeit ist, daß die hohe Progesteronkonzentration den Spermien- und Oozytentransport verändert. Eventuell kamen einige der Follikel auch nicht zur Ovulation, wurden jedoch luteinisiert. Letztendlich könnte durch die Stimulation mit EPE auch die Qualität der Oozyten vermindert sein. Diese These kann durch bisherige Studien jedoch nicht belegt werden (Dippert et al. 1994; Brück et al. 2000).

Der Effekt einer Behandlung mit EPE wurde auch im Bezug auf die Oozytengewinnung untersucht (Brück et al. 2000). Während des Östrus wurden bei Stuten alle Follikel über 4 mm aspiriert (erste Aspiration). Über die nächsten acht Tage wurde einer Gruppe 25 mg EPE täglich verabreicht, einer Kontrollgruppe wurde nur physiologische Kochsalzlösung injiziert. Am achten Tag wurden wiederum alle Follikel über 4 mm aspiriert (zweite Aspiration). Das Follikelwachstum zwischen erster und zweiter Aspiration, sowie die Anzahl, Größe und Reifung der Follikel bei der zweiten Aspiration waren für beide Gruppen gleich, ebenso die Anzahl der gewonnenen Oozyten. Auch die Konzentration an Meiose aktivierenden Sterolen (FF-MAS und T-MAS) in der Follikelflüssigkeit wurde durch die EPE-Behandlung nicht beeinflusst. So zeigte die Behandlung mit EPE in diesem Versuch weder einen Einfluß auf das Wachstum der kleinen Follikel, noch auf die Anzahl der zu gewinnenden Oozyten oder die Oozytenreifung.

Bei sämtlichen bisher angeführten Versuchen wurden experimentell hergestellte Rohextrakte aus Pferdehypophysen verwendet. Kommerziell hergestellte Produkte sind derzeit nicht erhältlich.

## **2.2 Follikelstimulierendes Hormon (FSH)**

Die Behandlung von Stuten ab Tag 6 post ovulationem zweimal täglich mit 8-32 mg Folltropin, einem kommerziell erhältlichen porcinen FSH-Präparat, konnte die Anzahl der Doppelovulationen verglichen mit der Kontrollgruppe deutlich erhöhen. Zeigten vor der Behandlung 20 % der Stuten Doppelovulationen, konnten nach der Behandlung bei bis zu 80 % der Stuten Doppelovulationen festgestellt werden (Sirois et al. 1992; Fortune und Kimmich 1993). Vor der FSH-Verabreichung wurde bei den Stuten am Tag 5 und 6 post

ovulationem die Luteolyse mit je einer Injektion von 5 mg  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ausgelöst. SIROIS und Mitarbeiter stellten fest, daß die Dosis von 8 mg FSH zweimal täglich am effektivsten ist. Die Stuten wurden durchschnittlich mit 16,9 Injektionen, entsprechend einer Gesamtdosis von 135,2 mg FSH, behandelt. Bei Vollblütern konnte die Anzahl an Doppelovulationen durch täglich einmalige Injektion von 16 mg FSH ab Tag 7 des Zyklus (Ovulation = Tag 0) von 14 % auf 55 % gesteigert werden (Braun et al. 1994). Am Tag 6, vor Beginn der Behandlung, wurde die Luteolyse mit  $\text{PGF}_{2\alpha}$  eingeleitet. Im Durchschnitt folgten in dieser Studie 9,4 Injektionen mit einer Gesamtdosis von 150 mg FSH. In einer vergleichenden Studie (Palmer et al. 1993) war die Ovulationsrate für mit EPE und FSH behandelte Stuten mit durchschnittlich 2,8 Ovulationen nahezu gleich, sie betrug für die im Winter behandelte FSH-Gruppe sogar  $3,5 \pm 0,5$  und lag somit höher als bisher berichtet. Verwendet wurde ein EPE-Präparat, das 6 % LH und 3 % FSH enthielt, und eine FSH angereicherte Fraktion desselben Extraktes mit 12,5 % FSH und 3 % LH. Trotz der erhöhten Ovulationsrate gegenüber der Kontrollgruppe konnte die Anzahl der gewonnenen Embryonen nicht erhöht werden. Die Verabreichung von FSH an Stuten, die der Oozytengewinnung dienen, hatte keinen Effekt auf die Oozytengewinnungsrate (bezogen auf die Anzahl der aspirierten Follikel) (Brück et al. 1997). Allerdings erhöhte sich die Anzahl der Follikel und dadurch auch die Anzahl der gewonnenen Oozyten von 2,0 und 3,2 auf 7,5. Die Oozytengewinnung wurde 24 Stunden nach Beendigung einer viertägigen Behandlung mit 100 mg Folltropin intramuskulär täglich durchgeführt. Von Nachteil für diese Methode ist, daß die benötigte FSH-Menge sehr hoch und dadurch die Behandlung extrem teuer ist.

### **2.3 Human Menopausal Gonadotropin (HMG)**

Da EPE kommerziell nicht erhältlich ist, wurden weitere Möglichkeiten zur Auslösung von Superovulationen getestet. Stuten wurden nach Luteolyse ab Tag 10 p.o. für sieben Tage mit unterschiedlichen Dosen humanem Menopausal Gonadotrophin (HMG) behandelt (Koene et al. 1991). Am Ende der Behandlung erfolgte eine dreitägige Verabreichung von hCG in einer Dosis von 250 IU zweimal täglich am Tag 17 und 18 und in einer doppelten Dosis am Tag 19. Die Ovulationsrate lag für HMG bei  $2,6 \pm 0,3$  gegenüber ausschließlicher hCG-Behandlung mit  $1,7 \pm 0,1$  und Kontrollgruppe mit  $1,1 \pm 0,1$ . Die Embryogewinnungsrate lag sowohl bei behandelten Stuten als auch bei der Kontrollgruppe bei 50 %.

## 2.4 Aktive und passive Immunisierung gegen Inhibin

Ein weiterer Ansatz zur Auslösung multipler Ovulationen ist die aktive und passive Immunisierung gegen Inhibin. Inhibin ist ein Glykoproteinhormon, das von den Granulosazellen der heranwachsenden Follikel produziert wird und die FSH-Ausschüttung unterdrückt. Durch die Immunisierung soll das endogene Inhibin neutralisiert und so das Follikelwachstum stimuliert werden (Forage et al. 1987; Mizumachi et al. 1990; Wrathall et al. 1990). Durch die fünfmalige Immunisierung mit einem synthetischen Schweine-Inhibin alpha-subunit Fragment im dreiwöchigen Abstand konnte im Zyklus nach der fünften Immunisierung eine Ovulationsrate von  $2,8 \pm 1,1$  erreicht werden (Kontrollgruppe  $1,1 \pm 0,1$ ). Die Rate der gewonnenen Embryonen lag mit  $1,6 \pm 0,5$  ebenfalls über der Kontrollgruppe ( $0,7 \pm 0,2$ ). Schon nach der dritten Immunisierung konnte bei vier der sechs behandelten Stuten ein deutlicher Anstieg an Antikörpern festgestellt werden, hohe Antikörpertiter waren nach der fünften Immunisierung bei fünf von sechs Stuten vorhanden. Eine direkte Beziehung zwischen Antikörpertiter und Ovulationsrate konnte nicht festgestellt werden (McCue et al. 1992). Eine ähnliche Ovulationsrate ergab die Immunisierung mit einem rekombinanten Rinder-Inhibin alpha-subunit Fragment zweimal im Abstand von 35 Tagen (McKinnon et al. 1992). Die Ovulationsrate lag nach der zweiten Injektion bei 2,3. Alle behandelten Stuten zeigten zwei oder drei Ovulationen in den Zyklen nach der Booster-Injektion.

Durch passive Immunisierung mit anti-Inhibin-Blutplasma konnte eine Ovulationsrate von  $1,6 \pm 0,2$  erzielt werden (McCue et al. 1993). Dabei wurde entweder zwei Liter Blutplasma am Tag 10 post ovulationem oder ein Liter am Tag 10 und ein weiterer am Tag 15 post ovulationem verabreicht. Das Plasma wurde von aktiv gegen Schweine-Inhibin immunisierten Stuten gewonnen. Diese Methode bietet gegenüber der aktiven Immunisierung den Vorteil, daß die mehrwöchige Immunisierungsphase entfällt. Von Nachteil sind die möglichen Nebenwirkungen: von den 15 immunisierten Stuten trat bei einer Urtikaria auf, die mit Cortison behandelt werden mußten, eine Stute verstarb nach 44 Tagen. Bei der pathologischen Untersuchung wurde eine Lebernekrose und Anzeichen intravaskulärer Hämolyse nachgewiesen, die eventuell auf die Verabreichung des Plasmas zurückzuführen sind.

## **2.5 Gonadotropin –Releasing-Hormon (GnRH)**

Eine andere Möglichkeit zur Auslösung von Ovulationen bzw. Mehrfachovulationen ist die Behandlung mit GnRH (Ginther und Bergfelt 1990). Stuten im Anöstrus wurde zweimal täglich 200 µg GnRH injiziert. Schon nach sechs Tagen konnte ein starkes Wachstum des größten Follikels festgestellt werden. Je größer dieser zu Beginn der Behandlung war, desto mehr Stuten ovulierten innerhalb von 21 Tagen. Bei einer Ausgangsgröße von 15-25 mm waren dies zwischen 62 und 100 %. Bei der Kontrollgruppe lag dagegen das kleinste Intervall bei 57 Tagen. Zudem konnten bei 31 % der behandelten Stuten Mehrfachovulationen festgestellt werden (davon 85 % Doppelovulationen, 15 % Dreifachovulationen) gegenüber 6 % bei der Kontrollgruppe. Somit scheint GnRH geeignet, während der anovulatorischen Jahreszeit Ovulationen auszulösen.

## **2.6 Lichtprogramm**

Der Einfluß verlängerter Tageslichtlänge auf die Ovaraktivität und die Embryogewinnung wurde in Polen untersucht (Kot und Tischner 1991). Dort wurden Stuten einer Tageslichtlänge von kontinuierlich 16 h ausgesetzt. Im Winter wurde das natürliche Licht durch künstliches Licht von 125 Lux ergänzt. Bei Stuten im Anöstrus, die diesem Lichtprogramm für sechs bis acht Wochen ausgesetzt waren, konnte Ovaraktivität festgestellt werden. Pro Jahr zeigten Stuten im Lichtprogramm ungefähr 19 % mehr Ovulationen als die Kontrollgruppe. Das Lichtprogramm hatte jedoch keinen Einfluß auf die Zahl der gewonnenen Embryonen.

## **2.7 Schlußfolgerung**

Zusammenfassend kann man sagen, daß die Anzahl der Ovulationen nach Stimulation in den meisten Fällen auf drei begrenzt bleibt. Die Embryogewinnungsraten variieren bei stimulierten Stuten sehr stark. Einige Autoren berichten von einer bis zu dreimal höheren Embryogewinnungsrate als bei der Kontrollgruppe, während bei anderen Untersuchungen die Anzahl der gewonnenen Embryonen zwischen stimulierten Stuten und der Kontrollgruppe nahezu gleich war. Der Einsatz von equinem Hypophysenextrakt (EPE) ist limitiert, da kein



kommerzielles Präparat auf dem Markt ist. FSH ist kommerziell erhältlich, der Einsatz ist jedoch sehr teuer, da zur Stimulation hohe Dosen notwendig sind. Mit eCG können bei der Stute keine Mehrfachovulationen ausgelöst werden. Durch die Anwendung von hCG zusätzlich zu EPE oder FSH können die Ovulationen synchronisiert werden. Die aktive Immunisierung gegen Inhibin hat den Nachteil, daß sie erst nach mehreren Wochen Behandlungsdauer wirksam wird. Zudem ist die Wirkungsdauer schlecht steuerbar. Die passive Immunisierung ist wegen schwerwiegender Nebenwirkungen nicht einsetzbar. Während der Wintermonate eignen sich sowohl die GnRH-Applikation als auch ein Lichtprogramm, um die Ovaraktivität zu stimulieren und Stuten zur Ovulation zu bringen. Derzeit werden die meisten Stuten während eines Embryotransferprogrammes nicht stimuliert und die Versuche beschränken sich auf die Gewinnung einzelner Embryonen.

### 3. Synchronisation der Spender- und Empfängerstuten

Die Bereitstellung zyklussynchroner Empfängerstuten ist für den Erfolg eines Embryotransferprogrammes von großer Bedeutung und stellt einen der Hauptkostenpunkte des kommerziellen Embryotransfers dar. Die Zyklussynchronisation ist beim Pferd aufgrund der eingeschränkten Möglichkeiten zur Beeinflussung des Ovulationstermins problematisch. Die Dauer des Östrus bei der Stute beträgt zwischen fünf und sieben Tagen, die Ovulation findet, in Relation zur Dauer des Östrus, 24 bis 48 Stunden vor dessen Ende statt. Sowohl die Dauer des Östrus als auch der Zeitpunkt der Ovulation sind aber sehr variabel. Obwohl mehrere effektive Methoden zur Induktion des Östrus entwickelt wurden, ist damit die exakte Bestimmung des Ovulationszeitpunktes noch nicht erreicht (Meyers 1997). Als zyklussynchron werden Empfängerstuten bezeichnet, die in einem Zeitraum von einem Tag vor (+1) bis drei Tage nach (-3) der Spenderstute ovulieren (McKinnon et al. 1988; Squires und Seidel 1995). Innerhalb dieser Zeitspanne hatte der Grad der Synchronität zwischen Spender und Empfänger nur unwesentlichen Einfluß auf die Trächtigkeitsrate. Es sollten pro Spenderstute zwei Empfängerstuten bereitgehalten werden, um die Wahrscheinlichkeit, einen passenden Empfänger nutzen zu können, zu erhöhen. Von gleichen Trächtigkeitsraten bei Empfängerstuten, die einen Tag vor oder nach der Spenderstute ovulierten, wurde schon zuvor berichtet (Oguri und Tsutsumi 1980; Imel et al. 1981). Untersuchungen an der Colorado State Universität zeigten, daß die Trächtigkeitsrate bei Empfängerstuten, die zwei Tage nach der Spenderstute ovuliert hatten, am höchsten ist. Dies stimmt mit den Beobachtungen in anderen Studien überein, in denen die Trächtigkeitsrate besser ist, wenn die Empfänger nach der Spenderstute ovulieren (Oguri und Tsutsumi 1980; Douglas 1982). Weitere Untersucher erzielten mit Synchronbereichen von 0 bis -2 Tagen (Douglas et al. 1985) oder +1 bis -2 Tagen (Iuliano et al. 1985) bessere Ergebnisse als mit dem Bereich von +1 bis -3 Tagen.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, zyklussynchrone Empfängerstuten bereitzustellen. Eine Herde von Stuten im natürlichen Zyklus, aus der bei Bedarf die passende Empfängerstute ausgesucht werden kann, wäre eine ideale Lösung. Hierzu sind jedoch Herdengrößen von 30 (Pascoe et al. 1985) bis 90 (Iuliano et al. 1985) Stuten nötig, um möglichst zu jedem Zeitpunkt einen passenden Empfänger zur Verfügung zu haben. Aufgrund der hohen Unterhaltskosten für diese Empfängertier-Herden wird in den meisten Fällen auf andere Methoden zurückgegriffen. Diese bestehen zum einen in der Synchronisation des

Östrus, zum anderen in der Auslösung der Ovulation. Die zur Synchronisation des Östrus verwendeten Hormone sind Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) und dessen synthetische Analoga, sowie die Steroidhormone Progesteron, Östradiol und Pro-Gestagene (Allyl-Trenbolon). Zur Induktion der Ovulation verwendet man humanes Choriongonadotropin (hCG) oder Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) sowie dessen synthetische Analoga. Eine Zusammenfassung der einzelnen Methoden findet sich in Tabelle 1 (S. 18). Eine weitere Möglichkeit besteht in der Verwendung ovariektomierter, hormonbehandelter Empfängerstuten.

### **3.1 Synchronisation des Östrus**

#### **3.1.1 Prostaglandin $F_{2\alpha}$ und dessen Analoga**

Die luteolytischen Eigenschaften von  $PGF_{2\alpha}$  bei der Stute wurden schon 1972 aufgezeigt (Douglas und Ginther 1972). Durch die induzierte Rückbildung des Gelbkörpers wird der Diöstrus verkürzt (Länge des Diöstrus bei Behandlung mit  $PGF_{2\alpha}$ -Analogum  $12,0 \pm 0,6$ ; natürliches  $PGF_{2\alpha}$   $12,4 \pm 0,8$ ; unbehandelte Kontrollgruppe  $17,0 \pm 0,7$  Tage) (Brockschmidt et al. 1985). Es kann allerdings nur dann ein deutlicher Effekt erzielt werden, wenn ein ansprechbarer Gelbkörper vorhanden ist (Bristol 1987). Dies ist bei den meisten Stuten erst am Tag 4 bis 6 post ovulationem der Fall (Ginther 1992; Irvine 1993). Findet aufgrund des Prostaglandins eine Regression des Corpus Luteum statt, kommt die Stute circa zwei bis vier Tage nach der Behandlung in den Östrus. Die Ovulation findet im Durchschnitt sieben bis 12 Tage (zwei bis 15 Tage möglich) nach der Prostaglandin-Applikation statt (Ginther 1992). Ist bei Einleitung der Luteolyse ein Follikel über 40 mm vorhanden, kann die Stute sogar innerhalb von 24 bis 72 Stunden ovulieren. Bei diesen Stuten sind häufig nur minimale oder gar keine Anzeichen des Östrus zu beobachten. Alternativ kann ein großer Follikel auf die Behandlung jedoch auch mit einer Regression reagieren. Dieser Regression folgt dann die Entwicklung einer neuen Welle von Follikeln, die Ovulation findet dann frühestens neun bis zehn Tage nach der Prostaglandin-Gabe statt (Loy et al. 1979). Eine Möglichkeit der Applikation besteht in der einmaligen intramuskulären Injektion von 250 bis 500  $\mu\text{g}$  eines  $PGF_{2\alpha}$  Agonisten (Cloprostenol, Estrumate®, ICI Pharmaceuticals) im Diöstrus (zwischen Tag 7 bis 15 post ovulationem) (Allen et al. 1985). Auch die subkutane Injektion von 5 mg

PGF<sub>2α</sub> ( Dinoprost, Lutalyse®, Upjohn) kann alternativ angewendet werden (Sirois et al. 1987). In einer Studie wird die zweimalige Applikation einer Dosis PGF<sub>2α</sub> im Abstand von 14 bis 18 Tagen empfohlen, um alle Stuten einer Gruppe zu synchronisieren (Asbury 1988).

### **3.1.2 Steroidhormone (Progesteron und Östradiol)**

Durch die Verabreichung von Progesteron wird der Diöstrus verlängert, indem die Plasma- Progesteron-Konzentration künstlich erhöht gehalten wird, bis sich die Gelbkörper aller behandelten Tiere zurückgebildet haben. Durch das Progesteron wird ein negativer Feedback auf das Luteinisierungshormon ausgelöst, wodurch die Follikelreifung und Ovulation verhindert werden. Die Dosis liegt bei Behandlungsbeginn im Diöstrus bei 100 mg täglich. Diese liegt höher, wenn die Behandlung im Östrus begonnen wird. Nach Absetzen der Behandlung mit 100-200 mg Progesteron (ölige Suspension) i.m. einmal täglich über sieben bis zehn Tage, kommen die Stuten nach zwei bis sieben Tagen in Östrus. Die Injektionen können schmerzhaft sein und Serome, Abszesse und Fibrosen an der Injektionsstelle verursachen (Meyers 1997). Durch die Kombination mit Östradiol-17β wird zusätzlich zur Follikelreifung auch deren Wachstum unterdrückt. Die verwendete Dosis liegt bei 10 mg täglich (Loy et al. 1981). Die Verabreichung von 10 mg PGF<sub>2α</sub> am letzten Tag der Behandlung gefolgt von 2500 IU hCG i.m. bei Vorhandensein eines 35 mm großen Follikels resultierte in mehr als 70 % der Stuten in einer Ovulation 10-12 Tage nach der letzten Progesteroninjektion (Blanchard und Varner 1994). Die Synchronisation des Östrus ist auch durch intravaginal anzuwendende Spiralen, die für Rinder zugelassen sind (Controlled Internal Drug Release Dispenser=CIDR-B, InterAg, Neuseeland), möglich (Jöchle et al. 1991; Arbeiter et al. 1994). Die Spiralen werden für 12 bis 14 Tage intravaginal belassen. Bei Kombination mit PGF<sub>2α</sub> am Tag der Entfernung der Spirale tritt der Östrus ca. zwei bis vier Tage nach Entnahme der Spirale ein, die Ovulation findet nach durchschnittlich 7,1±2,3 Tagen statt (Klug und Jöchle 2001).

### 3.1.3 Allyl-Trenbolon

Allyl-Trenbolon ist ein synthetisch hergestelltes Gestagen (sog. Pro-Gestagen). Die orale Verabreichung von Allyl-Trenbolon (Altrenogest, Regumate®, Roussel-Uclaf, Paris, Frankreich) über 15 Tage in einer Dosierung von 0,044 mg/kg KGW bewirkt eine Zyklusblockade mit einem nachfolgenden Rebound-Phänomen (Imel et al. 1981). Das Intervall vom letzten Behandlungstag bis zum Östrus betrug  $5,0 \pm 2,4$  Tage, bis zur Ovulation vergingen durchschnittlich  $10,2 \pm 3,6$  Tage. Wird am letzten Tag der Altrenogest-Behandlung zusätzlich  $\text{PGF}_{2\alpha}$  injiziert, kommen die Stuten schon nach zwei bis fünf Tagen in Östrus (Meyers 1997). Auch die Anwendung von Allyl-Trenbolon über Vaginalschwämme wurde beschrieben (Driancourt und Palmer 1982; Palmer 1985). Die Vaginalschwämme werden mit 0,5 g Altrenogest durchtränkt und mit einem Antibiotikum überzogen. Sie werden für acht Tage in der Vagina belassen, am Tag der Entfernung wird zusätzlich ein Prostaglandin-Analogum (z.B. Cloprostenol) injiziert. Dieses Behandlungsschema führte  $11 \pm 2,8$  Tage nach Cloprostenolgabe zur Ovulation. Durch die zusätzliche Behandlung mit Testosteron kann die Synchronität der Ovulationen gegenüber alleiniger Verwendung eines Vaginalschwammes anscheinend weiter verbessert werden. Die Kombination von Allyl-Trenbolon und Testosteron führt offenbar zu einer noch stärkeren Reduktion der LH-Sekretion als die Verabreichung von Allyl-Trenbolon alleine, während die FSH-Sekretion nicht beeinflusst wird. Die ersten Ovulationen traten bei der kombinierten Allyl-Trenbolon / Testosteron Behandlung nicht vor Tag 9 nach der Schwammentfernung auf, während bei der alleinigen Verwendung von Allyl-Trenbolon die ersten Ovulationen schon am zweiten und siebten Tag auftraten. Durch das Testosteron scheinen die ersten Ovulationen nach Schwammentfernung unterdrückt zu werden (Palmer 1985). Die Stuten bekommen am Tag der Platzierung des Vaginalschwammes eine Injektion von 100 mg Testosteron, danach für vier Tage eine Dosis von 50 mg. Die Verwendung von Vaginalschwämmen ist mit dem Risiko schwerer Vaginitiden verbunden und hat sich nicht durchgesetzt (Neely 1988).

## 3.2 Induktion der Ovulation

### 3.2.1 Humanes Choriongonadotropin (hCG)

Humanes Choriongonadotropin hat bei anderen Spezies eine Wirkung ähnlich dem Luteinisierungs-Hormon (Follikelreifung und Ovulation) und wird aus dem Urin schwangerer Frauen extrahiert. Eine Dosis von 2500 IU wird intravenös verabreicht, sobald die Stuten im Östrus einen Follikel mit einer Größe von 35 mm oder mehr aufweisen. Dies führt zu einer Verkürzung des Östrus und die Ovulation findet 24 bis 48 Stunden später statt (Ginther und Pierson 1989). Das Stadium der follikulären Entwicklung zum Zeitpunkt der Verabreichung ist sehr wichtig. Wird hCG verabreicht, bevor der Follikel eine Größe von 30 mm erreicht hat, ist die Reaktion auf die Behandlung unsicher. Deshalb ist eine wiederholte Follikelkontrolle (alle 48 Stunden) von essentieller Bedeutung (Meyers 1997). Bei Follikeln von über 30 mm konnte kein Einfluß der Follikelgröße auf den Ovulationszeitpunkt festgestellt werden. Stuten mit einer Follikelgröße von 30-34 mm wiesen mit 83,7 % ähnlich viele Reagenten innerhalb von 24-48 h auf wie Stuten mit einer Follikelgröße von  $\geq 40$  mm (89,2 %) (Bollwein und Braun 1999). Die sonographisch darstellbare Ödematisierung des Endometriums (Radspeichenstruktur) wird von denselben Untersuchern, zusammen mit dem Duldungsreflex und der Follikelgröße, als weiteres Kriterium zur Bestimmung des Injektionszeitpunktes genannt. Die Ödematisierung des Endometriums reflektiert indirekt die Östrogenproduktion des dominanten Follikels und weist einen charakteristischen Verlauf im Östrus auf, wobei die stärkste Ausprägung ein bis zwei Tage vor der Ovulation zu erwarten ist (Ginther und Pierson 1984; Griffin und Ginther 1991). Die wiederholte Anwendung von hCG bei einer Stute resultiert in der Produktion von Antikörpern gegen das Glykoprotein-Hormon, die aber keine Kreuzreaktion mit endogenem LH aufweisen und die Wirksamkeit von exogen zugeführtem hCG zur Ovulationsinduktion offenbar nicht behindern (Roser et al. 1979) (Wilson et al. 1990). Die Rolle der Antikörper bei der Reduktion der Effizienz von hCG bei folgenden Behandlungen ist jedoch umstritten. Wiederholt mit hCG behandelte Stuten reagierten ebenso auf die hCG-Injektion wie Stuten, bei denen erstmalig die Ovulation mit hCG induziert wurde. Der Anteil der Reagenten (Ovulation 24 bis 48 Stunden nach hCG Injektion) betrug bei einmaliger bzw. wiederholter hCG-Behandlung 88,3 % (1x), 80,0 % (2x) und 93,3 % (3x und mehr). In keinem Fall wurden nach wiederholter Anwendung Anzeichen einer anaphylaktischen Reaktion beobachtet (Bollwein und Braun 1999). Trotzdem wird

allgemein empfohlen, hCG aufgrund seiner immunogenen Eigenschaften bei nicht mehr als zwei aufeinanderfolgenden Zyklen innerhalb derselben Saison einzusetzen (Perkins 1999).

### **3.2.2 Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) und dessen Analoga**

Das Gonadotropin-Releasing-Hormon stammt aus dem Hypothalamus und führt an der Hypophyse zur Sekretion der gonadotropen Hormone FSH und LH. Zur Behandlung stehen das natürliche GnRH sowie dessen stärker wirksame Analoga Deslorelin und Buserelin (bis zu 100 fach stärkere Wirkung als GnRH) zur Verfügung. Eine Einzeldosis zeigte sich als nicht effektiv in der Auslösung von Ovulationen (Heinze und Klug 1975; Michel et al. 1986; Vidament et al. 1992). Die pulsierende Verabreichung von GnRH über Arzneimittelpumpen (20 µg/h) zeigte einen deutlichen Fortschritt in der Auslösung der Ovulation (Johnson 1986). Diese Methode ist jedoch sehr aufwendig und lässt sich schlecht in die Praxis übertragen. Deslorelin ist erhältlich als kurzwirksames subkutanes Implantat Ovuplant™ (Fort Dodge). Es enthält 2,1 mg Deslorelinazetat und wird subkutan implantiert, wenn im Östrus ein Follikel mit einem Durchmesser von mehr als 30 mm vorhanden ist (Jöchle 1995). Bei großbrahmigen Warmblutstuten wird ein Follikeldurchmesser von 35-40 mm empfohlen (Klug et al. 1992; Meinert et al. 1993; Lübbecke et al. 1994). Nach dieser Behandlung werden mehr als 80 % der Ovulationen innerhalb von 48 Stunden beobachtet. Die Behandlung mit Ovuplant™ hatte keine negativen Auswirkungen bezüglich Trächtigkeitsrate, embryonaler Mortalität, sowie Vitalität der geborenen Fohlen. Wiederholte Behandlungen beeinträchtigen die Wirkung nicht. Allerdings können Gewebsreaktionen an der Implantatstelle auftreten, die jedoch in der Regel ohne Behandlung abheilen. Der Wirkmechanismus von Ovuplant™ ist in einer anhaltenden Freisetzung von LH und FSH zu sehen (Jöchle 1995). Im Gegensatz zu Rind, Schwein, Schaf oder Ziege findet man bei der Stute keinen präovulatorischer LH-Gipfel. Vielmehr wird bei der Stute ein anhaltender LH-Anstieg während der Rosse, mit Gipfelbildung 20 bis 24 Stunden nach der Ovulation, beobachtet. Allerdings konnte man während der Rosse einen kritischen LH-Schub finden, der 48 h vor der Ovulation einsetzt und sich durch einen deutlich steileren Anstieg von LH auszeichnet, der etwa zwölf Stunden anhält (Michel 1989). Man vermutet, daß Ovuplant™, zum richtigen Zeitpunkt angewendet, den kritischen präovulatorischen LH-Anstieg provoziert, der für die in 24 bis 48 Stunden nachfolgende Ovulation verantwortlich ist. Die notwendige Dauer des Anstiegs beträgt

offensichtlich 12 bis 24 Stunden. Hierdurch wird das Phänomen erklärt, daß eine einmalige GnRH-Gabe die Ovulation nicht provozieren kann.

In neueren Studien zeigten einige mit Ovuplant™ behandelte Stuten im darauffolgenden Zyklus eine verlängerte Zeitspanne bis zum Östruseintritt und verlängerte interovulatorische Intervalle (Farquhar et al. 2001). Dieser Effekt wurde noch verstärkt, wenn die Stuten zur Verkürzung der Lutealphase mit PGF<sub>2α</sub> behandelt wurden. Durch die Entfernung der Deslorelinazetat-Implantate konnten die Probleme beseitigt werden. Deshalb wird vermutet, daß die Implantate über einen längeren Zeitraum Deslorelinazetat abgeben. Hohe oder über längere Zeit verabreichte Dosen Deslorelin führen offenbar zu einer verminderten Ansprechbarkeit der hypophysären Rezeptoren auf GnRH. Daher kommt es zu einer verminderten Sekretion an Gonadotropinen.

Ein weiteres Behandlungsschema besteht in einer Kombination von Gestagenen und GnRH. Zuerst wird intravaginal eine Spirale mit 1,9 g Progesteron CIDR-B (InterAG) und 10 mg Östradiol eingesetzt (= Tag 0 der Behandlung). Am Tag 12 der Behandlung wird die Spirale entfernt und es werden 5 mg des PGF<sub>2α</sub>-Analogums Dinoprost i.m. verabreicht. Bis zu 100 % der Stuten befinden sich am Tag 14 im Östrus. Bei Vorhandensein eines 40 mm großen Follikels wird dann Ovuplant™ subkutan plaziert. Die Ovulation findet innerhalb der behandelten Gruppe nahezu synchron  $15,4 \pm 0,8$  Tage nach Behandlungsbeginn statt (Klug und Jöchle 2001). Eine weitere Möglichkeit der Ovulationsinduktion besteht in der Anwendung von Buserelin (Receptal®, Intervet). Das Behandlungsschema beinhaltet entweder vier Injektionen von 20 µg Buserelin alle 12 h oder drei Injektionen 13,33 µg Buserelin alle 6 h. Die Therapie wird begonnen, sobald im Östrus ein Follikel mit dem Durchmesser von 33 mm oder mehr vorhanden ist (Bruyas et al. 2000; Barrier-Battut et al. 2001). Die Ovulation findet durchschnittlich  $39,5 \pm 3,1$  h bzw  $43,1 \pm 2,1$  h nach Applikation statt.



**Tabelle 1:** Häufig verwendete Behandlungsschemen zur Östrussynchronisation und zur Induktion der Ovulation (modifiziert nach East (East et al. 1998) )

Exogenes Hormon	Dosis	Applikation	Zeitpunkt der Applikation	Wirkung
PGF <sub>2α</sub> (Lutalyse®, Pharmacia&Upjohn)	5-10 mg	i.m.	5 Tage post ovulationem oder zwei Injektionen im Abstand von 14 bis 18 Tagen	Induktion der Luteolyse, Stuten kommen nach ca. 2-4 Tagen in Östrus, je nach Follikelstatus
Cloprostenol (Estrumate®, Bayer)	250-500 µg	i.m.	wie oben	wie oben
Altrenogest (Regu-mate®, Hoechst-Roussel)	0,044 mg/kg KGW	oral	über 15 Tage täglich, am letzten Tag PGF <sub>2α</sub> od. Cloprostenol i.m.	Verlängerung der Luteal- phase, Stuten kommen nach Behandlungsende nach 2 bis 5 Tagen in Östrus
hCG (Ovogest®, Intervet)	2500-3500 IU	i.v.	einmalige Injektion im Östrus, wenn der Follikel ≥ 35 mm	fördert die Follikel- reifung, verkürzt den Östrus, induziert die Ovulation zwischen 24 und 48 h nach Injektion
Deslorelinazetat (Ovuplant™, Fort Dodge)	2,1 mg	s.c.	einmalige Implantation im Östrus, wenn der Follikel ≥ 30 mm, Implantat evtl. nach Ovulation wieder entfernen	fördert die Follikel- reifung, verkürzt den Östrus, induziert die Ovulation innerhalb 48 h
Buserelin (Receptal®, Intervet)	20 µg  13,3 µg	i.v.  i.v.	4 Injektionen im 12 h- Intervall  3 Injektionen im 6 h-Intervall im Östrus, wenn der Follikel ≥33 mm	Ovulation nach Ø 39,5±3,1 h  Ø 43,1±2,1 h

KGW= Körpergewicht

### 3.3 Ovariectomierte, hormonbehandelte Empfängerstuten

Eine weitere Möglichkeit zur Bereitstellung geeigneter Empfänger stellt die Verwendung ovariectomierter, hormonbehandelter Stuten dar. Der Effekt der Ovariectomie bei trächtigen Stuten wurde durch HOLTAN und Mitarbeiter untersucht (Holtan et al. 1979). Trächtige Stuten wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Gestation ovariectomiert. Zwischen Tag 25 und 45 der Gestation führte der Eingriff bei allen 14 Stuten innerhalb von zwei bis sechs Tagen zum Abort. Neun von 20 Stuten abortierten innerhalb von zehn bis 15 Tagen nach Ovariectomie zwischen Tag 50 und 70 der Trächtigkeit. Die Ovariectomie am Tag 140 oder 210 der Gestation führte dagegen zu keinem Abort, alle 12 Stuten trugen ihr Fohlen aus. Bei allen ovariectomierten Stuten konnte ein Abfall der Plasma-Progestagene unter 2 ng/ml gemessen werden. Stuten, die am Tag 25 der Trächtigkeit ovariectomiert wurden, und für zehn oder 20 Tage täglich 100 mg Progesteron verabreicht bekamen, konnten die Trächtigkeit während dieser Behandlung aufrecht erhalten, abortierten jedoch vier bis sechs Tage nach Beendigung der Injektionen. Bei nicht trächtigen, ovariectomierten Stuten, denen über acht Wochen täglich 50 oder 100 mg Progesteron injiziert wurde, konnten Veränderungen des Uterus betreffend Tonus, Länge und Dicke festgestellt werden, entsprechend den Veränderungen bei Stuten während der frühen Trächtigkeitsphase. Die Plasma-Progesteron-Konzentration lag während der Behandlung mit 50 mg Progesteron bei über 2 ng/ml, während der Behandlung mit 100 mg Progesteron konnten Werte von über 5 ng/ml gemessen werden. Die Ergebnisse dieser Studie ließen vermuten, daß die Ovarien ab einem Zeitpunkt zwischen 50 und 70 Tagen der Gestation zur Aufrechterhaltung der Trächtigkeit entbehrlich sind. Die Plazenta wäre dann in der Lage, eine ausreichende Menge an Gestagenen zu produzieren. Die Tatsache, daß exogenes Progesteron den Uterustonius erhöhen und die Trächtigkeit nach Ovariectomie erhalten kann, ließ vermuten, daß Progesteron das hauptverantwortliche Hormon zur Aufrechterhaltung der frühen Trächtigkeit ist.

In einer anderen Studie wurde untersucht, wieviel Progesteron verabreicht werden muß, um bei ovariectomierten Stuten die Trächtigkeit aufrecht zu erhalten. Zudem testete man die Wirkung von Pro-Gestagenen, die den Vorteil haben, daß sie einfacher appliziert werden können (Shideler et al. 1982). Bei der intramuskulären Injektion von Progesteron gibt es häufig lokal entzündliche Reaktionen, die durch orale Medikation vermieden werden könnten. Die trächtigen Stuten wurden zunächst in sechs Behandlungsgruppen eingeteilt. Gruppe 1: unbehandelte Kontrollgruppe, Gruppe 2: 250 mg Progesteron in öliger Suspension s.c. alle zwei Tage, Gruppe 3: 500 mg Repositol Progesteron (Reprogest: Burns Biotec

Laboratories, Omaha, NE 68103) i.m. alle vier Tage, Gruppe 4: 1000 mg Repositol Progesteron i.m. alle vier Tage, Gruppe 5: 22 mg eines oralen Progestagen, Allyl-Trenbolon (Altrenogest, Regumate®, Roussel-UCLAF, Paris) täglich, Gruppe 6: 44 mg Allyl-Trenbolon oral täglich (siehe auch Tabelle 2). Die Hormontherapie wurde am 29. oder 30. Tag der Trächtigkeit begonnen und weitergeführt bis zum 100. Tag der Trächtigkeit oder zum Zeitpunkt des Abortes. Die Ovariectomie der Stuten wurde am 34. oder 35. Tag der Trächtigkeit durchgeführt. Der Erfolg der einzelnen Behandlungsschemata bezüglich des Erhalts der Trächtigkeit ist aus Tabelle 2 ersichtlich. Der sicherste Behandlungserfolg war bei Behandlung mit Repositol Progesteron 1000 mg alle vier Tage i.m. oder mit Allyl-Trenbolon 22 bzw. 44 mg oral täglich zu beobachten.

**Tabelle 2:** Behandlungsschema und Erhalt der Trächtigkeit

Gruppe	Medikament	Behandlung	Erhalt der Trächtigkeit	Trächtigkeitstag der Aborte im Durchschnitt
1	Kontrollgruppe	keine	0 von 8 Stuten = 0 %	38,5-39,5
2	250 mg Progesteron	alle 2 Tage, s.c.	5 von 8 Stuten = 62,5 %	43-44
3	500 mg Repositol Progesteron	alle 4 Tage, i.m.	1 von 8 Stuten = 12,5 %	40,1-41,1
4	1000 mg Repositol Progesteron	alle 4 Tage, i.m.	8 von 8 Stuten = 100 %	kein Abort
5	22 mg Altrenogest	täglich, per os	7 von 8 Stuten = 87,5 %	20
6	44 mg Altrenogest	täglich, per os	7 von 8 Stuten = 87,5 %	40

Die Plasma-Konzentration von Progesteron vor der Ovariectomie und der Behandlung lag bei allen Gruppen ungefähr gleich zwischen 5,2 und 7,3 ng/ml. Nach der Ovariectomie lagen die Werte für Gruppe 4 mit durchschnittlich 4,5 ng/ml am höchsten, für Gruppe 2 bei 3,0 ng/ml und für die restlichen Gruppen bei 2,0 bis 2,3 ng/ml. Der Test (Radioimmunoassay) für Progesteron spricht nicht auf Allyl-Trenbolon an, das demnach nicht gemessen wurde. Der Anteil der Aborte war bei Stuten mit Progesteronkonzentrationen unter 2,0 ng/ml höher als bei Stuten mit darüber liegenden Werten, bei allen Stuten konnte jedoch vor dem Abort ein Abfall der Konzentration auf unter 4,0 ng/ml gemessen werden. Demnach nehmen die Verfasser an, daß zum Erhalt der Trächtigkeit eine Plasma Progesteronkonzentration von mindestens 4 ng/ml notwendig ist. Dieser Wert liegt über dem bisher angenommenen von 2 ng/ml. Von einem Erfolg bei der Behandlung mit Allyl-Trenbolon wurde auch beim Embryotransfer eines Pferdeembryonen in eine Maultierstute im Anöstrus berichtet (Davies et

al. 1985). Die Maultierstute erhielt täglich oral Allyl-Trenbolon, beginnend fünf Tage vor dem Transfer des Embryonen. Der Konzeptus entwickelte sich bis zum 50. Tag der Trächtigkeit normal, wurde dann allerdings resorbiert. Trotzdem wird deutlich, daß die Ovarfunktion an sich anscheinend nicht notwendig ist, um eine Trächtigkeit zu etablieren.

Ein weiteres Behandlungsschema ovariectomierter Empfängerstuten sowie dessen Auswirkungen auf das hormonale Profil (Progesteron, Östrogen, FSH, LH) wurde von HINRICHS und Mitarbeitern an langzeit-ovariectomierten Stuten getestet (Hinrichs 1985; Hinrichs et al. 1987). Die Ovariectomie wurde mindestens zehn Monate vor Versuchsbeginn durchgeführt. Über die hormonalen Anforderungen bei langzeit-ovariectomierten Tiere zur Etablierung einer Trächtigkeit liegen bisher auch bei anderen Spezies noch keine Untersuchungen vor. Die Stuten erhielten 300 mg Progesteron i.m. täglich beginnend fünf Tage vor dem Transfer. Im Falle einer Trächtigkeit wurde die Behandlung bis zum Tag 100 der Trächtigkeit fortgeführt. Drei von vier Embryotransfers waren erfolgreich, die Stuten trugen lebende Fohlen aus mit normaler Geburt, Kolostrumbildung, Laktation und normalem mütterlichem Verhalten. Der Östrus selbst mit seinen damit verbundenen Hormonausschüttungen scheint also nicht notwendig zu sein, um eine Trächtigkeit etablieren zu können.

Wahrscheinlich produziert der Pferdeembryo schon am achten Gestationstag Östrogene (Flood et al. 1979; Zavy et al. 1979; Heap et al. 1982). Nach dem Transfer könnte das vom Embryo produzierte Östrogen zu den Umweltbedingungen des Uterus beitragen, indem es dessen Tonus oder die glanduläre Sekretion stimuliert oder zur maternalen Erkennung der Trächtigkeit beiträgt. HINRICHS und Mitarbeiter konnten in ihrer Studie während der frühen Trächtigkeit keinen Anstieg des peripheren Plasma Östrogens nachweisen (Hinrichs et al. 1987). Deshalb wird vermutet, daß das vom Embryo produzierte Östrogen auf lokaler Ebene seine Wirkung entfaltet. Für keines der gemessenen Hormone konnte in den ersten 20 Tagen der Gestation ein deutlicher Unterschied zwischen trächtigen und nicht trächtigen ovariectomierten Stuten festgestellt werden. Die Progesteronkonzentration ovariectomierter Stuten entsprach den Werten einer intakten Kontrollgruppe (10-15 ng/ml) und blieb auch nach Beendigung der Therapie am Tag 100 der Gestation über einem Level von 4 ng/ml. Der Anstieg von Östrogen bei trächtigen Stuten ab Tag 50 der Trächtigkeit ist auf die Synthese von Östrogen durch die Plazenta zurückzuführen. Die FSH-Konzentration war bei ovariectomierten Stuten (20-35 ng/ml) höher als bei intakten (7-23 ng/ml) und blieb auf einem konstanten Level. Dies mag mit dem Fehlen des vom Ovar stammenden Inhibin in Zusammenhang stehen. Der deutliche Abfall der LH-Konzentration während der ersten zehn

Tage bei ovariectomierten Stuten ist möglicherweise eine Folge der durch Progesteron induzierten Suppression der Hypophyse. Bei den trächtigen Stuten reflektiert ein deutlicher Anstieg der LH-Konzentration ab Tag 36 der Gestation die Produktion des equinen Choriongonadotropins (eCG). Alle Stuten lagen ab Tag 40 bei einer Konzentration von über 100 ng/ml. Diese Werte entsprechen auch Angaben von intakten trächtigen Stuten (Kindahl et al. 1982; Urwin und Allen 1982).

In einer weiteren Studie an der Universität von Pennsylvania wurde Altrenogest getestet, um langzeit-ovariectomierte Stuten als Embryoempfänger vorzubereiten (Hinrichs et al. 1986). Die Stuten wurden mindestens drei Wochen vor Beginn der Versuche ovariectomiert. Stuten in Gruppe A erhielten 22 mg Altrenogest per os täglich ab dem fünften Tag vor dem Transfer. Gruppe B wurde mit 66 mg Altrenogest per os täglich ab dem sechsten Tag vor dem Transfer behandelt und Gruppe C erhielt 300 mg Progesteron in öliger Suspension i.m. täglich ab dem fünften Tag vor dem Transfer. Als Kontrollgruppe wurden intakte, synchronisierte Stuten verwendet. Die Trächtigkeitsrate betrug für Gruppe A: eine von sechs (16,6 %), Gruppe B: zwei von sechs (33,3 %), Gruppe C: zwei von fünf (40 %) und für die Kontrollgruppe 13 von 19 (68 %). Die Trächtigkeitsrate von Gruppe A unterscheidet sich deutlich von jener der Gruppen B, C und der Kontrollgruppe. Stuten der Gruppe A zeigten zudem einen schlechten Tonus des Uterus und der Zervix. Die Ergebnisse zeigen, daß ovariectomierte Stuten, die mit Altrenogest vorbereitet wurden, fähig sind, nach dem Embryotransfer eine Trächtigkeit zu etablieren. Allerdings scheint die Dosis von 22 mg Altrenogest, die auch für die Östrusunterdrückung empfohlen wird, für optimale Trächtigkeitsraten zu niedrig zu sein. Die Tatsache, daß bei einer früheren Untersuchung mit dieser Dosierung gute Ergebnisse erzielt wurden, könnte eventuell mit dem späteren Zeitpunkt der Ovariectomie (34. oder 35. Tag der Trächtigkeit) in Verbindung stehen. Die hier erfolgreiche Dosis von 66 mg Altrenogest würde bei einer Behandlung bis zum 100. Tag der Trächtigkeit einen erheblichen Kostenfaktor darstellen. Bei zwei der Stuten aus Gruppe C wurde nach wiederholtem Transfer Flüssigkeit im Uterus festgestellt. Da Progesteron die Resistenz des Uterus gegenüber Infektionen herabsetzen kann, ist es möglich, daß es durch die wiederholten Manipulationen zur Ansiedlung von Mikroorganismen gekommen ist und sich so eine Endometritis entwickelt hat. Nach Beendigung der Behandlung verschwand die Flüssigkeit innerhalb weniger Tage und es konnten keine Mikroorganismen nachgewiesen werden.

Der Zeitpunkt des Beginns der Hormonbehandlung bei ovariectomierter Stuten scheint Einfluß auf die Trächtigkeitsrate zu haben (Hinrichs und Kenney 1987). Stuten, die

mindestens 21 Tage vor dem Versuch ovariectomiert waren, wurden in zwei Gruppen unterteilt : Gruppe A wurde ab dem zweiten Tag nach der Ovulation der Spenderstute (entspricht fünf Tage vor dem Transfer) täglich mit 300 mg Progesteron in ölicher Suspension i.m. behandelt, während Gruppe B mindestens vier Tage vor der Ovulation der Spenderstute (entspricht 11 Tage vor dem Transfer) nach demselben Behandlungsschema behandelt wurde. Die Trächtigkeitsrate am Tag 18 betrug für Gruppe A: sechs von acht Stuten (75 %) und für Gruppe B: eine von 12 Stuten (8,3 %). Es wird deutlich, daß die Synchronität zwischen Spenderovulation und Beginn der Progesteronbehandlung für die Etablierung einer Trächtigkeit nach dem Embryotransfer eine wichtige Rolle spielt. Der Grund für diese Forderung blieb jedoch in diesen Versuchen durch die Tendenz der Stuten, durch eine längere Progesteronbehandlung nach dem Transfer Infektionen zu entwickeln, verborgen.

In einem Experiment an der Colorado State Universität wurde versucht, die Menge an Progesteron und Altrenogest zu ermitteln, die mindestens nötig ist, um eine Trächtigkeit zu erhalten (McKinnon et al. 1988). Hierzu wurden die mindestens 60 Tage vor Beginn der Versuche ovariectomierten Empfängerstuten in drei Gruppen unterteilt. Die Behandlung wurde begonnen, sobald eine Spenderstute sich im Östrus befand und einen Follikel mit einer Größe von mindestens 35 mm hatte. Stuten in Gruppe 1 erhielten 1 mg Östrogen in 3 ml ölicher Suspension s.c. einmal täglich bis zur Ovulation des Spenders, mindestens jedoch drei und höchstens fünf Injektionen. Ab dem Tag der Ovulation wurden täglich 300 mg Progesteron in ölicher Suspension i.m. verabreicht bis zum 35. Tag der Gestation oder zum Abort. Gruppe 2 erhielt dieselbe Behandlung, allerdings wurde die Östrogenbehandlung bis zum Tag 20 post ovulationem weiter geführt. In beiden Gruppen wurde die Progesteron-Dosis ab Tag 35 der Trächtigkeit reduziert wie aus Tabelle 3 ersichtlich. Gruppe 3 erhielt die Östrogenbehandlung wie bei Gruppe 1 beschrieben. Ab dem Tag der Ovulation wurden 0,044 mg/kg KGW Altrenogest täglich oral verabreicht bis zum Tag 35 der Trächtigkeit (dies entspricht bei einem 500 kg schweren Pferd einer täglichen Dosis von 22 mg). Die Altrenogest-Dosis wurde, wie auch die Progesterondosis, ab Tag 35 der Trächtigkeit reduziert (siehe Tabelle 3). Gruppe 4 bestand aus intakten Kontrollstuten. Alle Embryonen wurden sieben Tage post ovulationem chirurgisch übertragen. Am 14. und 35. Gestationstag lag die Trächtigkeitsrate aller Gruppen ungefähr gleich bei 70-80 %. Hiermit konnten die weit schlechteren Ergebnisse von HINRICHS und Mitarbeitern (Hinrichs et al. 1986) mit der Dosis von 22 mg Altrenogest täglich nicht bestätigt werden. Die Frage, ob eine Östrogenbehandlung vor der Gestagengabe notwendig ist, kann durch diesen Versuch nicht beantwortet werden. In den bereits erwähnten Versuchen war der Embryotransfer auch ohne

Östrogenbehandlung erfolgreich. Allerdings konnte in vorherigen Studien gezeigt werden, daß Östrogene die Anzahl der Progesteron-Rezeptoren erhöhen (Zavy et al. 1979). Da Östrogene auch vom Pferdeembryo produziert werden erwartete man, daß die kombinierte Steroidbehandlung der Gruppe 2 eventuell die Trächtigkeitsrate gegenüber der alleinigen Gestagenbehandlung der Gruppe 1 erhöhen könnte. Die Trächtigkeitsraten der beiden Gruppen waren jedoch gleich. Dies läßt vermuten, daß das vom Konzeptus produzierte Östrogen ausreichend ist, um eine Trächtigkeit zu etablieren und eine Erhöhung des Östrogenlevels keinen Vorteil bietet. Die Anzahl der 14 Stuten in Gruppe 1 und 2, die während der Behandlung mit 200, 100, 50 oder 0 mg Progesteron abortierten, betrug 0, 2, 8 und 4. Die Anzahl der 14 Stuten in Gruppe 3, die abortierten, betrug während der Behandlung mit 0,022, 0,011, 0,0055 und 0 mg /kg KGW Altrenogest 0, 6, 4 und 3 (siehe auch Tabelle 3).

**Tabelle 3:** Effekt verminderter Gestagen-Gabe auf die Abortrate (McKinnon et al. 1988)

Gruppe		Tag der Trächtigkeit				
		<35	35-39	40-44	46-49	>50
1 und 2	Progesteron					
	Dosis in mg	300	200	100	50	0
	Anzahl der					
	Stuten trächtig	14	14	12	4	0
	Abort	0	0	2	8	4
3	Altrenogest					
	Dosis in mg/kg KGW	0,044	0,022	0,011	0,0055	0
	Anzahl der					
	Stuten trächtig	14	14	8	4	1
	Abort	0	0	6	4	3

KGW = Körpergewicht

Die Plasma-Progesteron-Konzentration nahm linear zur exogen vermindert verabreichten Progesteronmenge ab (siehe Tabelle 4). Dabei war die zum Erhalt der Trächtigkeit benötigte Menge niedriger als bisher vermutet (Shideler et al. 1982). Keine der Stuten abortierte bei einer exogenen Progesterondosis von 200 mg. 24 h nach Verabreichung zeigten die Stuten noch eine Plasmakonzentration von 2,56 ng/ml. Nur zwei Stuten abortierten bei einem Plasma-Progesteron-Level von 1,1 ng/ml. Der durchschnittliche Zeitpunkt des embryonalen

Todes in Gruppe 1 und 2 war Tag 48. Die Plasma-Progesteron-Konzentration betrug hier weniger als 1 ng/ml.

**Tabelle 4:** Progesteronkonzentration in ng/ml im Plasma ovariectomierter, trächtiger Stuten mit exogener Progesteronsubstitution (McKinnon et al. 1988)

<b>Progesterondosis in mg</b>	300	200	100	50
<b>Plasma-Progesteronspiegel in ng/ml</b>	4,76±0,48	2,56±0,24	1,10±0,10	0,46±0,05

Der Durchschnitt ±Standardabweichung basiert auf 28 Proben. Die Anzahl der Stuten der 300, 200, 100 und 50 mg Dosis waren 14, 14, 12 und 4.

Interessant erscheint die Tatsache, daß Altrenogest das bisher einzige bekannte Pro-Gestagen mit der Fähigkeit zum Erhalt der Trächtigkeit bei Stuten ohne vorhandenes Corpus luteum ist (McKinnon et al. 2000). Ab Tag 16 der Gestation wurde Stuten Medroxyprogesteronazetat, Hydroxyprogesteronhexanoat, Altrenogest, Norgestomet oder Megestrolazetat verabreicht. Nach induzierter Luteolyse mit PGF<sub>2α</sub> am Tag 18 der Trächtigkeit abortierten alle Stuten außer jener Gruppe, welcher Altrenogest verabreicht wurde (siehe Tabelle 5). Durch den Versuch läßt sich allerdings nicht mit Sicherheit sagen, ob die Stuten abortierten, weil zu wenig Wirkstoff verabreicht wurde, oder –was wahrscheinlicher ist- weil die verabreichten Pro-Gestagene nicht in der Lage waren, an die Progesteronrezeptoren des Endometriums zu binden.

**Tabelle 5:** Verlust der Trächtigkeit bei Behandlung mit synthetischen Pro-Gestagenen nach induzierter Luteolyse (McKinnon et al. 2000)

<b>Versuchs-Gruppe</b>	<b>Anzahl der Stuten</b>	<b>Behandlung ab Tag 16 der Gestation (nach den Angaben der Hersteller)</b>	<b>Ø Interwall zwischen Luteolyse und Abort in Tagen</b>
1	5	1000 mg Medroxyprogesteronazetat i.m. alle 7 Tage	4,2 ± 2,6
2	5	500 mg Hydroxyprogesteronhexanoat i.m. alle 4 Tage	3,4 ± 1,1
3	5	0,044 mg/kg KGW Altrenogest per os täglich	bis Versuchsende (Tag 30) kein Abort
4	5	15 mg Norgestamet (Implantate) s.c. einmalig	2 ± 0
5	5	500 mg Megestrolazetat per os täglich	3 ± 1,5

KGW= Körpergewicht



Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Trächtigkeitsraten nach Embryotransfer in ovariectomierte, Gestagen-behandelte und intakte Empfängerstuten gleich sind. Die tägliche Behandlung mit 200 mg Progesteron i.m. oder 0,022 mg/kg KGW Altrenogest per os reicht aus, um die Trächtigkeit in ovariectomierten Stuten zu erhalten. Die Gestagenbehandlung der Empfängerstuten sollte am Tag der Ovulation der Spenderstute beginnen oder wenn die Spenderstute einen Follikel mit dem Durchmesser  $\geq 35$  mm aufweist. Der Östrus selbst mit seinem Hormonprofil ist nicht notwendig, um eine Trächtigkeit etablieren zu können.

### 3.4 **Schlußfolgerung**

Die Zyklussynchronisation ist beim Pferd aufgrund der eingeschränkten Möglichkeiten zur Beeinflussung des Ovulationstermins problematisch. Als zyklussynchron werden Empfängerstuten bezeichnet, die in einem Zeitraum von einem Tag vor (+1) bis drei Tage nach (-3) der Spenderstute ovulieren. Innerhalb dieser Zeitspanne hatte der Grad der Synchronität zwischen Spender und Empfänger nur unwesentlichen Einfluß auf die Trächtigkeitsrate. Die Bereitstellung einer Herde von 30 bis 90 Stuten, aus der bei Bedarf die passende Empfängerstute ausgesucht werden kann, wäre die ideale Lösung. Allerdings sind Platzbedarf und Unterhaltskosten für solche Herden erheblich. Eine hormonale Induktion des Östrus ist mit  $\text{PGF}_{2\alpha}$  und dessen synthetische Analoga, sowie den Steroidhormonen Progesteron, Östradiol und Pro-Gestagenen (Allyl-Trenbolon) möglich. Für die Induktion der Ovulation können hCG und GnRH sowie dessen synthetische Analoga verwendet werden. Bei der Verwendung von hCG ist dabei das Stadium der follikulären Entwicklung zum Zeitpunkt der Verabreichung von entscheidender Bedeutung. Trotz der Behandlung bleibt eine geringe Variation des Ovulationszeitpunktes bestehen. Auch hormonbehandelte, ovariectomierte Stuten stellen eine Möglichkeit dar, synchrone Empfänger bereitzustellen. Allerdings müssten hier in Deutschland tierschutzrechtliche Aspekte berücksichtigt werden.

Die Synchronisation der Spender- und Empfängerstuten stellt einen der Hauptkostenpunkte eines Embryotransferprogrammes dar. Die Möglichkeit, große Pferdeherden kostengünstig zu halten, wie dies in den USA und Südamerika möglich ist, bringt große Vorteile bezüglich eines kommerziellen Einsatzes des Embryotransfers.

## 4. Embryonengewinnung

### 4.1 Auswahl der Spenderstute

Es gibt eine Reihe von Indikationen für die Anwendung eines Embryotransfers beim Pferd. Dies sind 1.) Stuten mit überdurchschnittlichen genetischen Anlagen, von denen pro Jahr mehr als ein Fohlen gezogen werden soll. 2.) Zweijährige Stuten: Diese sind zwar schon in der Lage, Embryonen zu erzeugen, es fehlt ihnen jedoch an körperlicher Reife, um ein Fohlen auszutragen. 3.) Stuten, die im Sport eingesetzt werden. Durch die Embryonengewinnung kann man Nachzucht bereitstellen, auch wenn die Stuten weiter an Wettbewerben teilnehmen. 4.) Subfertile Stuten, die nicht in der Lage sind, ein Fohlen auszutragen. 5.) Ältere Stuten, von denen der Züchter noch einmal ein Fohlen möchte. 6.) Stuten, die erst sehr spät im Jahr fohlen. Diese würden meist erst im folgenden Frühjahr wieder belegt werden, so daß ein Zuchtjahr verloren würde (McKinnon und Squires 1988; East et al. 1998).

Bei der Auswahl der Spenderstute für ein Embryotransfer-Programm müssen verschiedene Kriterien beachtet werden. Hierzu gehört der Reproduktionsstatus der Stute, die Fruchtbarkeit und der Standort des Hengstes bzw. des Samens, Reglementierungen der Zuchtverbände, der geschätzte Wert des resultierenden Fohlens und die Anzahl der gewünschten Trächtigkeiten (Squires et al. 1999). Die besten Embryonenspender sind ausgewachsene Stuten mit gesundem Reproduktionstrakt. Bei alten Stuten, sehr jungen Stuten, güsten Stuten und Stuten mit pathologischen Veränderungen am Uterus ist die Embryogewinnung weniger erfolgreich. Die Trächtigkeitsrate bei der Verwendung subfertiler Spenderstuten liegt bei nur 15 bis 20 %, während sie bei der Verwendung von fertilen Stuten bis zu 75 % erreichen kann (McCue et al. 2001). Andere Autoren geben an, daß die Embryogewinnungsrate (EG-Rate) bei älteren, subfertilen Stuten um ungefähr 30 % niedriger ist als bei fertilen Stuten (McKinnon und Squires 1988). Die Belegung erfolgt bei den meisten Spenderstuten durch künstliche Besamung. Die Entscheidung, ob frischer, gekühlter oder gefrorener Samen verwendet wird, hängt vom Standort der Stute und des gewählten Hengstes, der Verfügbarkeit des Hengstes, der Rasse und der Wahl des Besitzers ab (McCue et al. 2001). Von Seiten jener Zuchtverbände, welche Nachzucht aus Embryotransferprogrammen grundsätzlich akzeptieren, gibt es unterschiedliche Reglementierungen über die Anzahl der Nachkommen aus einer Stute während eines Jahres. Manche Zuchtverbände erkennen nur ein Fohlen pro Jahr und Stute an (z.B. American

Quarter Horse Association, Appaloosa Horse Club, Inc.), während bei anderen keine Obergrenze genannt wird (Tennessee Walking Horse Breeders' and Exhibitors' Association, American Shire Horse Association) (Bailey et al. 1995). In Deutschland gibt es zur Zeit von Seiten der Zuchtverbände keine Reglementierungen bezüglich des Embryotransfers.

## 4.2 Vorbereitung der Spenderstute

Wurde eine Stute als Embryospender ausgewählt, sollte sie zunächst eine gründliche gynäkologische Untersuchung durchlaufen. Die Stute sollte einen regelmäßigen Zyklus zeigen und sich in guter physischer Kondition befinden. Der Genitaltrakt wird rektal palpiert und durch Ultraschall dargestellt. Besondere Beachtung findet die Größe und der Tonus des Uterus und Größe, Form und Tonus der Zervix. Die Portio vaginalis cervicis wird auch bei einer vaginalen Untersuchung mit dem Spekulum nochmals beurteilt. Hierbei achtet man besonders auf Verklebungen und Ausfluß. Ferner wird eine bakteriologische Untersuchung des Uterus, eine Uteruszytologie und eventuell auch eine Uterusbiopsie mit histologischer Untersuchung durchgeführt (McKinnon und Squires 1988). Ideal wäre es, die Stute während der Dauer eines Zyklus zu beobachten, um Informationen über Zykluslänge, Ovarfunktion, Uteruston und Tonus der Zervix zu bekommen. Nach der Beobachtung einer Ovulation kann man den folgenden Zyklus bei Bedarf durch die Gabe von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  oder eines Analogums verkürzen. Falls der Embryotransfer sehr früh im Jahr durchgeführt werden soll, kann es notwendig sein, die zyklische Aktivität der Stute zu induzieren. Hierzu sind Lichtprogramme geeignet oder die Applikation von GnRH bzw. dessen Analoga (East et al. 1998). Stuten mit klinisch manifester Endometritis müssen entsprechend behandelt werden, bevor sie für die Embryonengewinnung verwendet werden (Spülungen mit Kochsalzlösung ( $> 2 \text{ l}$ ), die uterine Infusion von Antibiotika und / oder die Verabreichung von Oxytocin). Ist die Stute bereit, um als Embryospender zu dienen, wird die Deckbereitschaft durch tägliches „Probieren“ mit einem Hengst getestet. Befindet sich die Stute im Östrus wird sie täglich rektal mit Ultraschall untersucht, bis die Ovulation (= Tag 0) festgestellt wird. Die Untersuchung wird dann nicht weiter fortgesetzt, außer es ist noch ein weiterer Follikel  $\geq 35 \text{ mm}$  vorhanden (McKinnon und Squires 1988). Die Induktion der Ovulation ist durch Applikation von hCG oder GnRH möglich (siehe Kapitel „Synchronisation der Spender- und Empfängerstuten“). Die Belegung kann entweder im Natursprung oder über künstliche Besamung mit frischem, gekühltem oder tiefgefrorenem Samen erfolgen. Die Besamung sollte am Tag vor oder bis zu 12 Stunden nach

der Ovulation stattfinden. Eine mehrmalige Besamung kann durchgeführt werden. Die Anzahl motiler Spermien pro Besamungsportion sollte  $250-500 \times 10^6$  betragen (McKinnon und Squires 1988).

Die termingerechte Besamung ist von großer Bedeutung für den Erfolg eines Embryotransferprogrammes. Es kommt jedoch immer wieder vor, daß ein Hengst für zu viele Stuten vorgemerkt wurde, der Samen zu spät verschickt wird oder die Stute früher als erwartet ovuliert. Die Besamung der Stute nach der Ovulation ist in diesen Fällen die einzige Möglichkeit, um eventuell eine Trächtigkeit in diesem Zyklus zu erreichen. Die Berichte über den Erfolg solcher postovulatorischen Besamungen sind nicht einheitlich. Einige Autoren berichten von einer deutlichen Reduktion der Embryogewinnungsrate bei der Besamung innerhalb 12 Stunden post ovulationem gegenüber der praeovulatorischen Besamung (63 % postovulatorisch gegenüber 83 % praeovulatorisch) (Riera et al. 2000). Andere Autoren berichten, daß die Besamung innerhalb von 12 (Woods et al. 1990) oder 16 (Huhtinen et al. 1996) Stunden post ovulationem die Trächtigkeitsraten gegenüber der praeovulatorischen Besamung nicht signifikant verringert. Alle Autoren stimmen jedoch in der Aussage überein, daß die Embryonen aus postovulatorischen Besamungen in der Entwicklung verzögert sind und so im Entwicklungsstand hinter jenen aus praeovulatorischen Besamungen liegen. Diese Verzögerung könnte die Zeit reflektieren, die die Spermienkapazitation in Anspruch nimmt oder eine mögliche reduzierte Lebensfähigkeit der Oozyte. Die Reaktion des Uterus auf die Besamungen wird über Ultraschall beobachtet und jede Stute, die nach einer Besamung eine Flüssigkeitsansammlung im Uterus zeigt, wird mit Oxytocin, Prostaglandin und / oder einer Uteruslavage behandelt (Squires und Seidel 1995).

### **4.3 Techniken der Embryonengewinnung**

#### **4.3.1 Chirurgische Embryonengewinnung**

Die chirurgische Embryonengewinnung wird heute kaum noch angewendet und dann fast ausschließlich zu experimentellen Zwecken, um Embryonen aus dem Eileiter zu gewinnen. Ansonsten sprechen die Invasivität eines solchen Eingriffes und die Notwendigkeit zur wiederholten Embryonengewinnung bei den Spenderstuten gegen diese Technik. Der Eingriff wird unter Allgemeinanästhesie durchgeführt. Es wurde die Laparotomie von der Linea alba aus (Allen und Rowson 1975; Peyrot et al. 1987) als auch von der Flanke her (Ball et al.

1989) beschrieben. Die Spülung ist sowohl von den Fimbrien in Richtung Uterus (Allen und Rowson 1975) als auch retrograd (Peyrot et al. 1987; Ball et al. 1989) möglich. Bei der erstgenannten Technik wird zunächst ein kurzes Stück eines gebogenen Glasröhrchens mit abgeschrägtem Endstück durch eine kleine Inzision in die Spitze des Uterushorns geschoben. Durch eine Ligatur wird das Röhrchen am Uterus fixiert. Durch das Infundibulum wird nun eine stumpfe 18 G Nadel in den Eileiter geschoben. Von hier aus werden 30 bis 50 ml Spülmedium (hier wurde Tissue Culture Medium, TCM-199 verwendet) eingebracht, die durch das Glasröhrchen in Petrischalen aufgefangen werden. Der Embryo wird mikroskopisch identifiziert. Die Embryogewinnungsrate lag bei dieser Methode bei 77 %. Bei der retrograden Technik wird eine Exzision des Eileiters etwa 2 mm vor der Mündung in den Uterus vorgenommen. Die Eileitermembran, Mesosalpinx und Fimbrien werden von dem Eileiterstück entfernt. Dann wird in den Isthmus eine stumpfe 25 G Nadel geschoben, und der Eileiter wird mit 10 ml Medium (verwendet wurde Dulbecco's phosphate buffered saline modifiziert mit 10 % hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum, 0,1 % Dextrose, Natriumpyruvat, Streptomycinsulfat und Penicillin) retrograd gespült. Zunächst wird langsam gespült und einzelne Tropfen werden in einer Petrischale separat aufgefangen, dann wird mit 5 ml zügig durchgespült, diese Flüssigkeit wird in einer zweiten Petrischale aufgefangen. Die aufgefangene Flüssigkeit wird unter einem Mikroskop nach dem Embryo durchsucht. Meist wird der Embryo in einem der ersten Tropfen gefunden. Die Embryogewinnungsrate betrug 91 %. 20 von 21 Embryonen befanden sich im Stadium von über acht Zellen, ein Embryo befand sich im Vier-Zell-Stadium.

#### **4.3.2 Nicht-chirurgische Embryonengewinnung**

Die nicht-chirurgische Embryonengewinnung durch transvaginale Spülung des Uterus ist die heute fast durchweg gewählte Methode. Hierfür wird die Stute in einem Untersuchungsstand fixiert, eine Sedation ist in den meisten Fällen nicht nötig. Der Schweif der Stute wird einbandagiert und leicht angehoben zur Seite gehalten. Der im Rektum befindliche Kot wird entfernt. Dann wird die Perinealgegend zunächst mit Wasser und Seife und abschließend mit Alkohol gereinigt. Alle für die Embryonengewinnung verwendeten Utensilien sollten vor dem Eingriff sterilisiert werden (McKinnon und Squires 1988; East et al. 1999). Wird Ethylenoxid zur Sterilisation verwendet, müssen die Teile vor Gebrauch mindestens 48 Stunden lang entgast werden, da Ethylenoxid embryotoxisch ist und die Lebensfähigkeit der Embryonen

herabsetzen kann (Schiewe et al. 1985). In den Anfängen des equinen Embryotransfers wurde teilweise nur das zur Ovulation ipsilaterale Uterushorn gespült (Oguri und Tsutsumi 1972; Allen und Rowson 1975; Vogelsang et al. 1979; Oguri und Tsutsumi 1980). Dabei lag die Embryogewinnungsrate jedoch deutlich niedriger (40-45 %) als bei der Spülung des gesamten Uterus (87-90 %). Deshalb spült man heute Uteruskörper und Uterushörner gleichzeitig. Hierfür verwendet man einen Ballonkatheter (z.B. 18 Gauge, 30 ml French Foley Katheter (Vogelsang et al. 1979; Imel et al. 1981), 18 Gauge French Rusch Katheter (Douglas 1982), 30 French Gauge Gibbon balloon Katheter (Allen et al. 1985)). Dieser wird so eingeführt, daß der aufgeblasene oder mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllte Ballon knapp kranial des inneren Muttermundes sitzt (Oguri und Tsutsumi 1974; Imel et al. 1981). Je nach Größe der Stuten werden 500-1000 ml des körperwarmen Spülmediums auf einmal in den Uterus eingebracht und wieder abgehebert, insgesamt ca. drei Liter (Braun 1994). Bei Kaltblütern wurde die Verwendung von insgesamt fünf Litern Flüssigkeit beschrieben (Squires et al. 1982).

Bis zum Beginn der achtziger Jahre wurden als Spülmedium physiologische Kochsalzlösung mit 2 % Gelatine bzw. Kochsalzlösung mit Stutenserum (Oguri und Tsutsumi 1972; Oguri und Tsutsumi 1974) und Tissue Culture Medium (TCM-199) (Allen und Rowson 1975; Hershman und Douglas 1979; Vogelsang et al. 1979) verwendet. Heute wird als Spülmedium allgemein Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS) mit 1 % Serumzusatz verwendet (modifizierte PBS). Als Serumzusatz kann man hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (Allen et al. 1985; Bowen et al. 1985), Bullenserum (Imel et al. 1981) bzw. bovines Serumalbumin (Leidl und Braun 1987; Huhtinen et al. 1996) oder Pferdeserum (Leidl und Braun 1987) verwenden. Da fetales Kälberserum sehr teuer ist, werden häufig die letztgenannten Alternativen verwendet. Manche Untersucher verwenden zusätzlich Antibiotika (z.B. Penicillin, Streptomycin, Amphotericin B) im Spülmedium (Allen et al. 1985; Bowen et al. 1985; Woodward und Dawsett 1985; Sirois und Betteridge 1988). Nach ALVARENGA und Mitarbeitern ist Ringer-Laktat als Spülmedium genauso geeignet wie PBS. Auch der Zusatz von Serum bzw. Protein sei nicht notwendig (Alvarenga et al. 1993).

Die Infusion und das Abhebern des Spülmediums erfolgt über die Schwerkraft (Imel et al. 1981). Aber auch die Massage des Uterus vom Rektum aus zur Bewegung des Spülmediums im Uterus oder zu dessen Rückgewinnung wurde beschrieben (Woods und Ginther 1984; Allen et al. 1985). Die Bedeutung der manuellen Manipulation des Uterus für die Embryogewinnungsrate (EG) ist bisher jedoch noch nicht systematisch untersucht worden. Bei empfindlichen Stuten kann eine kontinuierliche Spülung des Uterus mit

getrenntem Zu- und Ablauf eingesetzt werden, um Abwehrreaktionen als Folge des starken Wechsels von Füllung und Entleerung der Gebärmutter zu vermeiden (Leidl und Braun 1987). Eine Verbesserung der Embryogewinnrate soll dadurch erreicht werden, daß die eingebrachte Spülflüssigkeit vor dem Abhebern für drei Minuten im Uterus verbleibt. Während dieser Zeit werden keine Manipulationen am Uterus vorgenommen. Durch die Wartezeit soll sichergestellt werden, daß von der Spülflüssigkeit alle Bereiche der Gebärmutter erreicht werden, bzw. ermöglicht werden, daß Kontraktionen der Gebärmutter den Embryo in das Spülmedium befördern (Hinrichs 1990). Mit dieser Methode konnte bei 13 von 15 Stuten mit Einzelovulationen ein Embryo gefunden werden (EG-Rate 87 %) und bei fünf Stuten mit Doppelovulationen konnten acht Embryonen gewonnen werden (EG-Rate 160 %). ALVARENGA und Mitarbeiter testeten diese Methode ebenfalls und konnten eine Verbesserung der Embryogewinnrate bestätigen. Bei der Standardtechnik lag die EG-Rate bei 55 %, während sie durch die Wartezeit von drei Minuten auf 75 % gesteigert werden konnte (Alvarenga et al. 1993).

Das Volumen des rückfließenden Spülmediums muß exakt bestimmt werden, um die eingebrachte Flüssigkeit so weit wie möglich (93-98 %) aus dem Uterus zu entfernen. Der Rückfluß beruht im wesentlichen auf der Kontraktion des Myometriums als physiologische Reaktion auf den Dehnungsreiz (Braun 1994). Falls große Teile der Spülflüssigkeit so nicht rückgewonnen werden können, besteht die Möglichkeit, Oxytocin zur Steigerung der Uterusmotilität zu verabreichen (20 IU intravenös), was die Austreibung des verbliebenen Spülmediums innerhalb von ein bis fünf Minuten zur Folge hat (Sertich 1989).

Die Art der Embryonensuche hängt vom Entwicklungsstand des Embryonen ab. Pferdeembryonen haben am achten Tag bereits einen Durchmesser von ca. 1 mm und können daher schon mit bloßem Auge erkannt werden. Zur Sicherheit wird aber auch dann das gesamte Spülmedium überprüft, um die eventuelle Anwesenheit eines zweiten Embryonen durch eine mögliche Doppelovulation nicht zu übersehen. Das rückgewonnene Spülmedium läßt man zunächst in dem Auffangglas (z.B. 1 Liter Erlenmeyer-Kolben) 15 Minuten stehen, damit ein eventuell darin schwimmender Embryo Richtung Boden sinken kann. Dann wird die Flüssigkeit bis auf ca. 100 ml abgehebert. Der abgeheberte Überstand wird zur Sicherheit nochmals durch einen Embryofilter geleitet, um einen eventuell darin enthaltenen Embryo nicht zu verlieren. Die 100 ml Bodensatz werden in Petrischalen gegossen und unter dem Stereomikroskop bei mindestens zwölfacher Vergrößerung durchsucht (Braun 1994). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, das rückgewonnene Spülmedium insgesamt durch einen Embryofilter (75 µm Porenweite) zu gießen. Dieser wird dann über einer Petrischale mit

frischer Spülflüssigkeit abgespült und diese nach Embryonen durchsucht (Fleury et al. 1989). Eine andere Methode besteht in der Verwendung eines Embryofilters, der schon in das Rückflußsystem eingebaut ist, ein sog. in-line Embryofilter (Vogelsang et al. 1985; Alvarenga et al. 1993; Riera und McDonough 1993). Dieser wird nach der Uterusspülung mit frischem Medium abgespült, das dann in einer Petrischale unter dem Mikroskop nach Embryonen durchsucht wird. Dadurch wird die ganze Prozedur verkürzt und Fehlerquellen bei der Auffindung eines Embryonen werden ausgeschaltet.

Wurde der Embryo gefunden, wird er mit einer Glaspipette nacheinander in drei Petrischalen, die jeweils kleine Mengen sterile PBS-Lösung mit 10 bis 20 % Serumzusatz enthalten, überführt. Diese Waschung soll mögliche Kontaminationen verdünnen. Danach wird der Embryo in einer Petrischale mit demselben Medium bei Raumtemperatur bzw. 37°C bis zum Transfer aufbewahrt. Der Transfer sollte so schnell wie möglich stattfinden, spätestens jedoch nach zwei Stunden (Imel et al. 1981; McKinnon und Squires 1988). Falls bei einer Spenderstute kein Embryo gefunden wurde, muß dies nicht unbedingt das Ausbleiben der Konzeption bedeuten. In solchen Fällen kann eventuell entweder sofort oder nach ein bis zwei Stunden im Anschluß an den ersten Embryogewinnungsversuch eine zweite Uterusspülung durchgeführt werden. Dabei konnten bei einer zweiten Spülung im direkten Anschluß an die erste von 21 Stuten vier Embryonen gewonnen werden, bei nochmaliger Spülung nach ein bis zwei Stunden zwei Embryonen von 21 Stuten. Aufgrund der geringen Erfolgsrate dieser wiederholten Uterusspülungen ist die Durchführung nur im Einzelfall, z.B. bei sehr wertvollen Spenderstuten, und nach vorheriger Abwägung des zusätzlichen Infektionsrisikos gerechtfertigt (Squires et al. 1992).

Im Anschluß an die Embryonengewinnung werden die Stuten mit einer luteolytischen Dosis Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  oder eines entsprechenden Analogums behandelt, um sicherzustellen, daß auch beim Zurückbleiben eines Embryonen keine Trächtigkeit bestehen bleibt und um die Stute in kurzem Abstand wieder in den Östrus zu bringen (McKinnon und Squires 1988). Durch die Luteolyse können Intervalle von weniger als 21 Tagen zwischen zwei Embryonengewinnungen erzielt werden (Braun 1994). Durch die sachgerechte nicht-chirurgische Embryonengewinnung wird die Fertilität der Spenderstuten nicht beeinflusst. Zu dieser Schlußfolgerung kamen Autoren, die Stuten mehrmals hintereinander zur Embryonengewinnung heranzogen. Bei 14 untersuchten Stuten wurden insgesamt 70 Uterusspülungen durchgeführt, dabei wurden 27 Embryonen gewonnen. Zwölf Stuten wurden im ersten Östrus nach der Embryogewinnung besamt, sechs Stuten wurden trächtig und trugen ein Fohlen aus. Die anderen Stuten wurden in der nächsten Saison wieder erfolgreich



als Spenderstuten verwendet (Tischner und Bielanski 1980). Bei gesunden Stuten, die bis zu zehnmal hintereinander zur Embryonengewinnung herangezogen worden waren, betrug die Embryogewinnungsrate (bezogen auf die Anzahl der Ovulationen) 64,3 % bei der ersten, 68,5 % bei der vierten und 70 % bei der achten Embryonengewinnung (Riera und McDonough 1993).

#### **4.4 Faktoren, die die Embryonengewinnung beeinflussen**

Die Embryogewinnungsrate wird durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst. Hierzu gehören der Zeitpunkt der Embryogewinnung nach der Ovulation, die Anzahl der Ovulationen, das Alter und die Fertilität der Spenderstute und die Qualität des Samens (Squires et al. 1999). Der frühestmögliche Zeitpunkt für eine nicht-chirurgische Embryonengewinnung ist der sechste Tag nach der Ovulation (Tag der Ovulation = Tag 0), da Pferdeembryonen erst nach 5 bis 5,5 Tagen in den Uterus gelangen (Oguri und Tsutsumi 1972; Betteridge et al. 1982; Freeman et al. 1991). Die Embryogewinnungsrate ist für die am Tag 6 post ovulationem durchgeführten Embryonengewinnungen etwas geringer als für die Tage 7, 8 und 9. Dies könnte auf verschiedene Ursachen zurückzuführen sein: 1.) Der Embryo wird vom Untersucher im Spülmedium nicht erkannt. 2.) Der Embryo geht aufgrund seiner kleinen Größe beim Spülvorgang verloren. 3.) Die Unfähigkeit, den Embryo aufgrund seines höheren spezifischen Gewichtes mit der Spülflüssigkeit aus dem Uterus zu erhalten. 4.) Der Embryo hat den Uterus am Tag 6 post ovulationem noch nicht erreicht. Von größerer Bedeutung sind wahrscheinlich die beiden letzten Punkte (McKinnon und Squires 1988). Der Vorteil bei der Gewinnung von sechs Tage alten Embryonen ist, daß sie für die Tiefgefrierkonservierung besser geeignet sind als ältere Embryonen (Slade et al. 1985). Sollen die Embryonen direkt übertragen werden, wird die Embryonengewinnung am Tag 7 oder 8 empfohlen (McKinnon und Squires 1988). Der Vorteil von neun Tage alten Embryonen ist, daß sie sicher mit bloßem Auge erkennbar sind und so die zeitaufwendige Suche mit dem Mikroskop entfällt. Die Erfahrung hat jedoch gezeigt, daß ältere (Tag 9) bzw. größere ( $\geq 2$  mm) Embryonen schlechtere Transferergebnisse (Embryotransfer: nicht-chirurgisch) zeigen als sieben oder acht Tage alte Embryonen (Iuliano et al. 1985; McKinnon und Squires 1988). Es gibt allerdings Vermutungen, daß die Embryoentwicklung und der Embryotransport durch den Eileiter bei alten Stuten verzögert sein kann. Dementsprechend könnte die

Embryongewinnung am Tag 8 oder 9 für diese Stuten eher geeignet sein (Squires et al. 1999).

Wie bereits erwähnt, hängt die Embryogewinnungsrate in erster Linie von der Fruchtbarkeit der Spenderstute ab. Bei gesunden Stuten wird die Befruchtungsrate (Tag 2 der Trächtigkeit) mit über 90 % angegeben (Ball et al. 1986; Ball et al. 1989; Carnevale et al. 1993). Hier können EG-Raten von 75 % (Imel et al. 1981), 80 % (Squires et al. 1982) oder sogar 87 % (Hinrichs 1990) erreicht werden. Dabei ist jedoch anzumerken, daß in solchen experimentellen Programmen häufig speziell geeignete Stuten mehrmals eingesetzt werden (Braun 1994). In einer Umfrage gaben amerikanische Pferdepraktiker eine Embryogewinnungsrate von 39 bis 75 % an (East et al. 1999). Bei alten, subfertilen Stuten liegt die Embryogewinnungsrate um ca. 30 % niedriger als bei fertilen Stuten (McKinnon und Squires 1988). Die Angaben variieren von 28 % (Douglas et al. 1985) bis 40 % (Woods et al. 1986). Dabei liegt die Befruchtungsrate (Tag 2 der Trächtigkeit) bei subfertilen Stuten noch bei 80 bis 90 % (Ball et al. 1986; Ball et al. 1989), während bei alten Stuten über 20 Jahren nur noch 55 % erreicht werden können (Carnevale et al. 1993). Die Berichte über die Embryogewinnungsrate von zweijährigen Spenderstuten variieren stark. Einige Autoren geben Embryogewinnungsraten von nur 36,3 % (Iuliano und Squires 1985) oder 50 % (Steiner und Jordan 1988) an, während andere mit 86 % (Savage et al. 1989) bzw. 87 % (Camillo et al. 2000) von keinem Unterschied zu ausgewachsenen, gesunden Stuten berichten können. Bei Stuten mit spontaner Doppelovulation ist die Embryogewinnungsrate praktisch verdoppelt (EG-Rate Einzelovulationen 53 % - Doppelovulationen 106 % (Squires et al. 1987); Einzelovulationen 87 % - Doppelovulationen 160 % (Hinrichs 1990)). Dies weist darauf hin, daß im Falle einer Doppelovulation beim Pferd beide Eizellen befruchtet werden und die sich entwickelnden Embryonen gleiche Chancen zur frühembryonalen Entwicklung haben.

#### **4.5 Frühe Embryonalentwicklung und morphologische Beurteilung der Embryonen**

Die morphologische Beurteilung der Embryonen ist aus zwei Gründen wichtig: zum einen ist die Trächtigkeitsrate beim Transfer abnormer Embryonen niedriger und zum anderen müssen unbefruchtete Eizellen von abnormen Embryonen unterschieden werden. Beurteilt werden die Form, die Farbe, die Anzahl und Dichte der Zellen, die Größe des Perivitellinspaltes, die

Anzahl ausgestoßener und degenerierter Zellen, Beschädigungen der Zona pellucida und der Entwicklungsstand verglichen mit dem Embryoalter (McKinnon und Squires 1988).

#### **4.5.1 Die Oozyte**

Die Befruchtung der Eizelle findet im Eileiter, am Übergang von Ampulla und Isthmus, statt (Austin und Short 1973). Die ovulierte Oozyte befindet sich in einem Stadium, in dem bereits ein Polkörperchen vorhanden ist, die Entwicklung wurde jedoch in der zweiten meiotischen Metaphase gestoppt. Die Befruchtung der Eizelle kann am Vorhandensein von zwei Pronuklei (maskuliner und femininer), des zweiten Polkörperchens oder an der Teilung erkannt werden. Die ovulierte Oozyte ist rund und hat eine Größe von 100-160  $\mu\text{m}$  (McKinnon und Squires 1988; Vanderwall 1996).

#### **4.5.2 Embryonalentwicklung im Eileiter (Tag 0-5 post ovulationem)**

Die erste Zellteilung findet nicht vor 24 Stunden statt, jede weitere Teilung benötigt ungefähr 12 Stunden. Dies bedeutet, daß sich der Embryo  $48 \pm 12$  Stunden nach der Ovulation im Vier- bis Acht-Zell-Stadium befindet (McKinnon und Squires 1986). Die durch Teilung entstandenen Zellen werden als Blastomeren bezeichnet. Die Form des Vier-Zell-Embryos ist oval, die Zona pellucida ist dick und wird von einem gelatinösen Überzug umgeben, wodurch der Embryo ein rauhes Erscheinungsbild haben kann (Betteridge et al. 1982). Die Größe des Embryos beträgt in diesem Stadium circa 120-180  $\mu\text{m}$ . Wird eine Eizelle nicht befruchtet, wird sie, im Gegensatz zu den meisten anderen Säugetieren, bei der Stute normalerweise im Eileiter zurückgehalten (sogenannter „selektiver Eileitertransport“) (Steffenhagen und Pineda 1972; Betteridge und Mitchell 1974; David 1975). Der Transport der Embryonen durch den Eileiter wird wahrscheinlich durch vom Embryo selbst produziertes Prostaglandin  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ ) initiiert. Drei und vier Tage alte Embryonen produzieren noch keine meßbaren Mengen an  $\text{PGE}_2$ , am fünften Tag werden Werte um  $5,7 \pm 1$  pg / Embryo gemessen. Am Tag 6 ist dann jedoch ein deutlicher Anstieg der  $\text{PGE}_2$  Menge von  $42,0 \pm 11,5$  pg / Embryo meßbar. Dies steht in zeitlicher Verbindung mit dem Eileitertransport. Proteine, Steroide oder andere Prostaglandine konnten nur in sehr niedrigen Mengen oder gar nicht nachgewiesen werden (Weber et al. 1991; Weber und Woods 1993).

Durch die kontinuierliche Infusion von 11 µg PGE<sub>2</sub> pro Tag in den Eileiter ab Tag 3 post ovulationem kann die Eileiterpassage von Embryonen signifikant verkürzt werden. Schon am vierten Tag nach der Ovulation konnten bei sechs von elf behandelten Stuten (54,5 %) Embryonen durch die Spülung des Uterus gewonnen werden. Der Eileitertransport war jedoch nicht auf Embryonen beschränkt, sondern es wurden auch unbefruchtete Eizellen und Detritus aus dem Eileiter in der Spülflüssigkeit gefunden. Die einmalige Infusion von PGE<sub>2</sub> in den Eileiter führte nur bei einer von 13 Stuten zum Erfolg (7,7 %). Durch die intramuskuläre, intraperitoneale und intrauterine Applikation von PGE<sub>2</sub> konnte der Eileitertransport nicht verkürzt werden, da PGE<sub>2</sub> in der Lunge metabolisiert wird, bevor es den Eileiter erreicht. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß eine kontinuierliche Sekretion von PGE<sub>2</sub> zum Eileitertransport notwendig ist. Da die Infusion von PGE<sub>2</sub> in den Eileiter zu einem nicht selektiven Eileitertransport von Embryonen, unbefruchteten Eizellen und Detritus führte, vermutet man für den selektiven Eileitertransport von Embryonen eine mehr lokale Wirkweise von PGE<sub>2</sub>. Eine andere Erklärung für den nicht selektiven Eileitertransport könnte die pharmakologische Dosis des infundierten PGE<sub>2</sub> sein (11 µg wurden infundiert gegenüber 271 pg, die bei sechs Tage alten Embryonen *in vitro* gemessen wurden) (Weber et al. 1991).

#### **4.5.3 Frühe Embryonalentwicklung im Uterus ( Tag 6-9 post ovulationem)**

Embryonen erreichen den Uterus zwischen 130 bis 142 Stunden post ovulationem (5 Tage, 10 Stunden bis 5 Tage, 22 Stunden) (Freeman et al. 1991). Zu diesem Zeitpunkt befinden sie sich im Stadium der Morula, einer kompakten Zellmasse mit  $\geq 32$  Blastomeren. Nun erfolgt die Umwandlung der Morula in die Blastula. Im Zentrum des Embryonen bildet sich ein flüssigkeitsgefüllter Raum, die sogenannte Blastocoele. Zudem erfolgt eine Differenzierung der Zellen: eine äußere Schicht, der sogenannte Trophoblast, und eine innere Zellmasse. Der Trophoblast absorbiert Nährstoffe und induziert Veränderungen am Uterus zum Zeitpunkt der Implantation. Zudem bildet er große Teile der fetalen Plazenta. Die innere Zellmasse bildet den Embryo sowie einige mit ihm verbundene Membranen (McKinnon und Squires 1988). Sobald die Entwicklung der Blastocoele abgeschlossen ist, nimmt der Konzeptus stark an Größe zu (Squires et al. 1985). Kommen die Blastomeren mit der Zona pellucida in Kontakt, verschwindet der Perivitellinspalt und der Embryo expandiert. Embryonen, die am Tag 6 post ovulationem gewonnen werden, befinden sich im Stadium der Morula oder frühen Blastozyste, die noch von einer deutlichen Zona pellucida umgeben sind. Je älter der Embryo

wird, desto dünner wird die Zona pellucida bis sie schließlich verschwindet. Der Embryo nimmt ständig an Größe zu (siehe Tabelle 6). Die meisten Embryonen, die am Tag 7 gewonnen werden, und alle Embryonen, die am Tag 8 und 9 gewonnen werden, sind expandierende Blastozysten (McKinnon und Squires 1988).

**Tabelle 6:** Tag der Embryogewinnung und Größe der Embryonen in mm (Squires et al. 1985)

Tag der Embryogewinnung	Anzahl der Embryonen	Durchschnittlicher Durchmesser	Bereich der gemessenen Durchmesser
6	121	0,208	0,132 – 0,756
7	144	0,406	0,136 – 1,460
8	142	1,132	0,120 – 3,980
9	41	2,220	0,730 – 4,520

Ab dem 6. Tag post ovulationem, gemeinsam mit dem Beginn der Bildung der Blastocoele, beginnt die Bildung einer dünnen, gleichmäßigen Schicht an der Innenseite der Zona pellucida (Flood et al. 1982). Diese azelluläre Membran wird „Kapsel“ genannt und ersetzt die Zona pellucida. Sie umhüllt den Pferdeembryo während der zweiten und dritten Woche der Trächtigkeit. Innerhalb eines Tages nach der Bildung der Kapsel wird die Zona pellucida und andere äußere Hüllen abgeworfen (Betteridge 1989). Über die Funktion der Kapsel gibt es verschiedene Spekulationen, wie die Bereitstellung einer passenden Mikrowelt (Betteridge und Flechon 1988), Schutzfunktion (Flood et al. 1982) oder die Ermöglichung der starken uterinen Wanderung des Pferdeembryonen (Ginther 1985). Die Kapsel besteht aus zwei Hauptkomponenten: einer Grundmasse mit kollagenähnlicher Struktur und einer Vielzahl Mucin ähnlicher Glykoproteine (Bousquet et al. 1987). Die Lysis der Kapsel erfolgt wahrscheinlich durch Proteinasen (Betteridge 1989). *In vivo* zeigt die Kapsel eine hohe Resistenz gegenüber einer „nicht-physiologischen“ Lysis; sie persistiert auch nach dem Eintreten des embryonalen Todes noch geschätzte weitere sieben Tage, eventuell bis zum Einsetzen einer neuen Trächtigkeit (Hinrichs und Watson 1988). Die Kapsel ist zäh und elastisch, so daß sie einer Ruptur trotz der möglichen Deformationen während der Embryonengewinnung widersteht. Einmal punktiert zerreißt die Kapsel leicht und neigt dazu, sich an den freien Enden einzurollen (Betteridge 1989). Die Bildung der Kapsel erfolgt unabhängig von der Zona pellucida. Bei der Reifung von Embryonen *in vitro* wird jedoch keine Kapsel gebildet (McKinnon et al. 1989). Daraus kann gefolgert werden, daß für die Bildung Faktoren des Uterus nötig sind, z.B. Uterusproteine, die mit dem Zeitpunkt der

Trächtigkeit variieren (Bousquet et al. 1987), oder Zellen des Trophoblasten (Betteridge und Guillomot 1982). Das relativ langdauernde Stadium, während dem die Zellen des Konzeptus von denen des Endometriums durch die Kapsel getrennt sind, setzt beträchtliche metabolische Austauschvorgänge voraus. Die Kapsel ist sowohl in der mobilen intrauterinen Phase als auch während der Fixation am 15. bis 17. Tag der Trächtigkeit vorhanden (Ginther 1983; Ginther 1985). Die Existenz der Kapsel überspannt entscheidende Stadien der embryonalen Entwicklung und der Etablierung der Trächtigkeit. Seine Rolle bei diesen Vorgängen ist noch immer nicht vollständig geklärt. Bisher konnte keine klare Verbindung zwischen einer Eigenschaft der Kapsel und dem Erfolg oder Mißerfolg der Gestation gefunden werden (Betteridge 1989).

#### 4.5.4 Beurteilung der Embryonen

Die Embryonen können in fünf Qualitätsgrade eingeteilt werden: Grad 1 = sehr gut bis Grad 5 = unbefruchtet oder tot (siehe Tabelle 7). Beurteilt werden die bereits genannten Kriterien Form, Farbe, Anzahl und Dichte der Zellen, Größe des Perivitellinspaltes, Anzahl ausgestoßener und degenerierter Zellen, Beschädigungen der Zona pellucida und der Entwicklungsstand verglichen mit dem Alter der Embryonen (McKinnon und Squires 1988). Ein modifiziertes System sieht nur noch die Einteilung in vier Qualitätsgrade vor. Dabei werden die bisher als Grad 5 beurteilten unbefruchteten Oozyten und toten Embryonen als schlecht = Grad 4 beurteilt (Carney et al. 1991; Ball et al. 1993).

**Tabelle 7:** System zur Beurteilung von Pferdeembryonen (McKinnon und Squires 1988)

Grad 1	sehr gut	ein idealer Embryo, spherisch, mit Zellen gleicher Größe, Farbe und Beschaffenheit
Grad 2	gut	wenige unbedeutende Unregelmäßigkeiten wie einige ausgestoßene Blastomeren, unregelmäßige Form oder separierter Trophoblast
Grad 3	befriedigend	deutliche, jedoch nicht ernsthafte Probleme, Vorhandensein ausgestoßener Blastomeren, degenerierte Zellen oder kollabierte Blastocoele
Grad 4	schlecht	ernsthafte Probleme, kollabierte Blastocoele, zahlreiche ausgestoßene Blastomeren, degenerierte Zellen, jedoch mit einer lebensfähig erscheinenden Embryo-Zellmasse
Grad 5	unbefruchtet oder tot	unbefruchtete Oozyten oder total degenerierte Embryonen

Die Trächtigkeitsraten für Embryonen, die mit Grad 3 und schlechter bewertet werden, sind geringer (17 % am Tag 15, 35 und 50 der Gestation) als die Trächtigkeitsraten für Embryonen mit Grad 1 und 2 (78 % am Tag 15, 73 % am Tag 35 und 70 % am Tag 50) (McKinnon und Squires 1988). Abnormale Embryonen zeigen vor allem verkleinerte Trophoblasten, die sich

von der Zona pellucida entfernt haben, dunkle Blastozysten mit unregelmäßiger Form, ausgestoßene Blastomeren, unregelmäßig geformte Embryonen oder Embryonen mit dunkler innerer Zellmasse. In einigen Fällen kann die Kapsel, die den Embryo umgibt, nach dem Abwerfen der Zona pellucida vergrößert erscheinen, so daß der Embryo von ihr scheinbar nur lose anhaftend umgeben wird. Dies könnte Veränderungen der osmotischen Verhältnisse mit begleitender Dehydrierung, speziell der Blastocoele, und damit Verkleinerung des Embryonen widerspiegeln. Die Lebensfähigkeit dieser Embryonen scheint dadurch nicht beeinträchtigt zu werden, falls die Rehydrierung während der Inkubation vor dem Transfer des Embryonen erfolgt (McKinnon und Squires 1988).

#### **4.5.5 Unbefruchtete Oozyten**

Unbefruchtete Eizellen werden normalerweise nicht in den Uterus weitergeleitet. Falls sie jedoch in den Uterus gelangen und bei einer Uterusspülung gewonnen werden, müssen sie von Embryonen unterschieden werden. Häufig werden unbefruchtete Oozyten gemeinsam mit einem Embryo aus dem Uterus gewonnen. Bei 30 von 210 Embryogewinnungsversuchen (Tag 6) konnte eine unbefruchtete Oocyte mit oder ohne Embryo gewonnen werden (14,3 %) (Wilson et al. 1991). Die frisch ovulierte Oocyte ist rund. Falls sie nicht befruchtet wird, beginnt sie langsam zu degenerieren. Oozyten konnten noch bis zu 150 und 230 Tagen post ovulationem aus dem Eileiter gewonnen werden. Allgemein degeneriert das Ooplasma schneller als die Zona pellucida. Das degenerierende Ooplasma zerfällt entweder in Teilstücke und kann eventuell eine Art Blastomerenanordnung erreichen, oder es wird langsam resorbiert, wobei es an Dichte verliert und eine Zelldifferenzierung nicht mehr möglich ist. Davon abgesehen bekommen die meisten unbefruchteten Eier eine ovale Form, sind in eine Richtung abgeflacht und haben eine Größe von 80-180 µm (McKinnon und Squires 1988).

#### **4.6 Schlußfolgerung**

Es gibt verschiedene Gruppen von Stuten, bei denen die Durchführung eines Embryotransfers wünschenswert wäre. Bei der Auswahl der Spenderstute müssen jedoch bestimmte Kriterien beachtet werden. Das wichtigste Kriterium im Hinblick auf die Erfolgsaussichten der

Embryongewinnung ist die Fruchtbarkeit der Stute. Die besten Embryonenspender sind erwachsene Stuten mit gesundem Reproduktionstrakt. Bei diesen Stuten kann die Embryogewinnungsrate zwischen 75 % und 87 % erreichen. Bei alten, subfertilen Stuten liegt die Embryogewinnungsrate dagegen nur zwischen 28 % und 40 %. Die Angaben über die Embryogewinnungsrate bei zweijährigen Stuten sind sehr unterschiedlich und reichen von 36,6 % bis 87 %. Bei spontanen Doppelovulationen ist die Embryogewinnungsrate praktisch verdoppelt. Dabei ist jedoch anzumerken, daß in vielen experimentellen Programmen häufig speziell geeignete Stuten mehrmals eingesetzt werden. In der Praxis des Embryotransfers beim Pferd wird eine Embryogewinnungsrate von 39-75 % erreicht.

Wurde eine Stute als Embryonenspender ausgewählt, sollte sie zunächst eine gründliche gynäkologische Untersuchung durchlaufen. Spenderstuten werden während des Östrus täglich rektal mit Ultraschall untersucht, bis die Ovulation festgestellt wird. Die Belegung kann entweder im Natursprung oder durch künstliche Besamung erfolgen. Die Spülung des gesamten Uterus (Uteruskörper und Uterushörner) durch einen transvaginal eingebrachten Katheter ist heute die Methode der Wahl zur Gewinnung der Embryonen (nicht-chirurgische Embryongewinnung). Je nach Größe der Stuten werden 500-1000 ml des körperwarmen Spülmediums auf einmal in den Uterus eingebracht und wieder abgehebert, insgesamt ca. drei Liter. Als Spülmedium wird heute allgemein Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS) mit 1 % Serumzusatz verwendet. Das rückgewonnene Medium wird entweder in einem Auffangglas 15 Minuten stehen gelassen und der Bodensatz schließlich in einer Petrischale unter dem Stereomikroskop durchsucht oder man verwendet einen sogenannten in-line Embryonenfilter. Der frühestmögliche Zeitpunkt für eine nicht-chirurgische Embryongewinnung ist der 6. Tag post ovulationem. Die Embryogewinnungsrate ist für diese Embryonen jedoch etwas geringer als für die Tage 7, 8 und 9. Sechs Tage alte Embryonen eignen sich durch ihre geringe Größe allerdings besser für die Tiefgefrierkonservierung. Die morphologische Beurteilung erfolgt in 4 oder 5 Abstufungen von sehr gut bis schlecht. Die Trächtigkeitsraten für Embryonen, die mit Grad 3 oder schlechter bewertet wurden, sind geringer als die Trächtigkeitsraten für Embryonen mit Grad 1 und 2.



## **5. Transfer von Embryonen**

### **5.1 Auswahl und Vorbereitung der Empfängerstuten**

Die sorgfältige Auswahl der Empfängerstuten ist ein wichtiger Faktor bezüglich des Erfolges eines Embryotransferprogrammes. Die Empfängerstuten sollten bestimmte Kriterien erfüllen. Hierzu zählt das optimale Gewicht ( zwischen 400 und 550 kg), das Alter ( zwischen drei und zehn Jahren), gutes Mutterverhalten und ein physiologisches Euter. Zudem sollten sie einen regelmäßigen Zyklus und keine Abnormalitäten der Ovarien und des Uterus aufweisen, wie etwa Flüssigkeit im Uterus, Uteruszysten oder Ovarialtumoren (Squires et al. 1999). Die Stuten sollten gegen Tetanus, Influenza und Virusabort geimpft sein (McKinnon und Squires 1988). Die potentiellen Empfängerstuten werden zunächst während des Diöstrus gynäkologisch untersucht. Diese Untersuchung beinhaltet eine rektale Untersuchung des Reproduktionstraktes inklusive Ultraschall und gelegentlich auch eine Bestimmung der Progesteronkonzentration im Blut. Man achtet besonders auf den Tonus von Uterus und Zervix, das Vorhandensein eines Gelbkörpers und eventuell vorhandene pathologische Flüssigkeitsansammlungen. Ungefähr 15 bis 20 % der untersuchten Stuten scheiden aufgrund pathologischer Befunde schon nach dieser gynäkologischen Untersuchung als Empfänger aus. Bei den verbleibenden Stuten sollte eine bakteriologische Untersuchung, eine Zytologie und eventuell eine Biopsie des Uterus durchgeführt werden. Stuten mit ungenügendem Tonus von Uterus oder Zervix, einem undeutlich ausgebildetem Corpus luteum oder anderen pathologischen Befunden werden von einem Transfer ausgeschlossen (McKinnon und Squires 1988; McCue et al. 2001). Die Trächtigkeitsraten sind für Empfängerstuten mit gutem bis sehr gutem Uteruston deutlich höher als für Empfänger mit einem befriedigenden bis schwachen Uteruston (Carnevale et al. 2000).

Während des Östrus werden die Stuten täglich am Hengst „probiert“ und es wird eine rektale Untersuchung bzw. die Ultraschalluntersuchung durchgeführt, um den Zeitpunkt der Ovulation zu bestimmen. Die Empfängerstuten sollten in einem Zeitraum von einem Tag vor bis drei Tage nach der Spenderstute ovulieren (Squires und Seidel 1995). Im Idealfall kann die Empfängerstute aus einer großen Herde mit 30 (Pascoe et al. 1985) bis 90 (Iuliano et al. 1985) Stuten jeweils passend ausgesucht werden. Steht eine solche Herde nicht zur Verfügung, kann die Synchronisation von Östrus bzw. Ovulation durch Hormontherapie erreicht werden (siehe Kapitel Synchronisation der Spender- und Empfängerstuten). Pro

Spenderstute sollten zwei Empfängerstuten bereitgestellt werden, um in jedem Fall einen passenden Empfänger nutzen zu können (McKinnon et al. 1988; Squires und Seidel 1995).

Häufig werden Maidenstuten und Stuten, die schon erfolgreich geföhlt haben, bevorzugt als Empfängerstuten verwendet (McKinnon und Squires 1988; East et al. 1998). In einer vergleichenden Studie wurde die Eignung von Ponystuten mit einem Körpergewicht von 135 bis 393 kg und größeren Stuten (Rasse Selle Francais) mit einem Körpergewicht von 385 bis 615 kg als Embryonenempfänger untersucht. Als Embryonenspender wurden Ponystuten verwendet. Nach transzervikalem Transfer von neun Embryonen in Ponystuten konnte keine Trächtigkeit etabliert werden, während aus neun Transfers in die größeren Stuten vier Trächtigkeiten resultierten (Lagneaux und Palmer 1989). Ponystuten scheinen als Empfängerstuten weniger geeignet zu sein als Stuten größerer Rassen. Bei ihnen konnte im Gegensatz zu den Selle Francais-Stuten eine verlängerte  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Ausschüttung nach dem Transfer gemessen werden. Manipulationen an der Zervix beim nicht-chirurgischen Transfer verursachen Veränderungen der elektrischen Aktivität des Myometriums, wodurch es zu einem Anstieg des  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Levels im Blut kommt (Taverne et al. 1979). Dieser ist aber nur von kurzer Dauer und schon bald nach Beendigung der Manipulation werden wieder physiologische Verhältnisse hergestellt. Die Zervix der Ponystuten war jedoch fester geschlossen und so beim Transfer schwieriger zu durchdringen als die Zervix der größeren Stuten (Lagneaux und Palmer 1989). Dies könnte eine verlängerte Ausschüttung von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  bedingt haben, wodurch die Etablierung der Trächtigkeit verhindert wurde.

Die Größe der Empfängerstute sollte allerdings auch im Hinblick auf das erwünschte Fohlen beachtet werden. Schon OGURI und TSUTSUMI stellten 1974 fest, daß die größte Empfängerstute auch das größte Fohlen zur Welt brachte (Oguri und Tsutsumi 1974). TISCHNER übertrug 19 aus Ponystuten gewonnene Embryonen in große, schwere Stuten mit einem Körpergewicht von 620 bis 800 kg, woraus fünf gesunde Fohlen hervorgingen. Diese waren bei der Geburt größer und schwerer als die in der Kontrollgruppe von Ponystuten ausgetragenen Fohlen. Die aus dem Embryotransfer entstandenen Fohlen wuchsen auch während der Saugperiode wesentlich schneller und waren zum Zeitpunkt der Veröffentlichung mit 2,5 Jahren noch immer größer als die Fohlen der Kontrollgruppe (Tischner 1985).

## **5.2 Zum Transfer von Embryonen verwendete Techniken**

Pferdeembryonen werden heute fast ausschließlich durch eine von zwei Techniken übertragen: chirurgisch von der Flanke aus oder nicht-chirurgisch durch transzervikalen Transfer. Grundsätzlich ist der nicht-chirurgische Transfer die Methode, welche für Personen, die pro Jahr nur wenige Embryotransfers durchführen, besser geeignet ist. Auch die geringe Invasivität und die niedrigen Kosten sprechen für dieses Verfahren. Die Trächtigkeitsraten nach transzervikalem Transfer variieren allerdings enorm, die Angaben der unterschiedlichen Embryotransfer-Teams reichen von 16 % (Riera und McDonough 1993) bis 71% (Allen und Rowson 1975; Wade et al. 1987). Der chirurgische Transfer wird vor allem von Kliniken und Instituten bevorzugt, die den Embryotransfer kommerziell betreiben. Der Vorteil des chirurgischen Transfers ist die konstant hohe Trächtigkeitsrate von 69 % (Squires et al. 1982) bis 80 % (Iuliano et al. 1985).

### **5.2.1 Chirurgischer Transfer von Embryonen**

Die ersten chirurgischen Transfers von Pferdeembryonen wurden unter Allgemeinanästhesie durch Laparotomie von der Linea alba aus durchgeführt (Allen und Rowson 1975; Imel et al. 1981). Dazu werden die Stuten in Rückenlage fixiert, die untere Bauchregion wird geschoren, gewaschen und desinfiziert. Die Inzision in der Linea alba beginnt ca. 10 cm cranial des Euters und ist 15 bis 20 cm lang. Die Spitze des Uterushorns ipsilateral zur Ovulation wird nach caudal gezogen und teilweise nach außen verlagert. Unter Schonung der Gefäße wird die Uteruswand penetriert, die Pipette mit dem Embryo eingeführt und der Embryo im Lumen deponiert. Nach Reposition des Uterus wird die Bauchhöhle wieder verschlossen. Da dieser Eingriff nur in Einrichtungen mit entsprechender Ausrüstung möglich war, testeten SQUIRES und Mitarbeiter die Durchführbarkeit des chirurgischen Transfer von der Flanke aus (Squires et al. 1982).

Hierzu werden die Stuten zunächst in einen Untersuchungsstand geführt und sediert. In der Region der Fossa paralumbaris wird ein etwa 35 cm breites und 45 cm langes Gebiet geschoren, gewaschen und desinfiziert. Das Gebiet der Inzision wird mit 35 bis 50 ml 2 % Lidocainlösung infiltriert, so daß oberflächliche und tiefe Gewebe desensibilisiert sind. Die vertikale Inzision erfolgt in der Mitte zwischen letzter Rippe und Tuber coxae, beginnend ca. 10 cm unterhalb der Querfortsätze der Lendenwirbel. Der Hautschnitt wird 15 –20 cm nach

ventral fortgeführt. Die Muskulatur wird mit Hilfe der Grid-Technik durchtrennt. Mit der Penetration des Peritoneums wird die Bauchhöhle eröffnet. Das proximale Drittel des Uterushorns wird nach außen verlagert und unter Schonung der Gefäße mit einer Kanüle punktiert. Durch diese Punktionsstelle wird der Embryo, der sich in einer Glaspipette oder einer Paillette mit etwas Kulturmedium (modifizierte PBS) befindet, an welche eine Spritze befestigt wurde, in das Uterushorn eingebracht. Nach Rückverlagerung des Uterushorns wird die Bauchhöhle wieder verschlossen. Die Stuten erhalten für die folgenden fünf Tage eine antibiotische Behandlung mit Procain-Penicillin, 9 Millionen IU pro Tag (Squires et al. 1982; McKinnon und Squires 1988; East et al. 1999). Da der Eingriff von der Flanke aus weniger traumatisch ist und zudem weniger Zeit und Geld kostet, ist diese Technik heute die Methode der Wahl.

Es gibt noch zwei weitere chirurgische Techniken, die zum Transfer von Pferdeembryonen entwickelt wurden, sich aber bisher nicht durchsetzen konnten: zum einen der transvaginale, zum anderen der endoskopische Transfer (Muller und Cunaat 1993). Beim transvaginalen Transfer wird zunächst eine sterile 450 mm lange Pipette in die Vagina eingeführt und neben der Zervix nach cranial geschoben. Vom Rektum aus wird das Uterushorn nach caudal gezogen, bis es an der Spitze der eingeführten Pipette positioniert ist. Dann wird eine 480 mm lange Nadel mit dem Durchmesser von 1,2 mm durch die Pipette geschoben, so daß die Wand der Vagina und das davorliegende Uterushorn punktiert werden. Durch diese Nadel wird ein 500 mm langes Plastikröhrchen mit dem Durchmesser von 1,0 x 0,7 mm geschoben, in dem sich der Embryo befindet. Das Plastikröhrchen wird bis zum Lumen des Uterushorns durchgeschoben und der Embryo plaziert. Der endoskopische Transfer wird von der Flanke aus vorgenommen. Die mittlere Region der Hungergrube zwischen letzter Rippe und Tuber coxae wird geschoren, gewaschen und desinfiziert und mit ca. 20 ml eines Lokalanästhetikums infiltriert. Die Optik des Endoskopes wird durch eine Inzision in die Abdominalhöhle eingeführt. Das Uterushorn wird ungefähr 5 cm rechts und links des Endoskopes ergriffen und fixiert. Unter Sichtkontrolle wird eine Nadel mit 1,2 mm Durchmesser nahe der Fixationspunkte in das Uterushorn eingeführt. Durch die Nadel wird wiederum ein Plastikröhrchen mit dem Embryo in das Lumen eingeführt und der Embryo plaziert. Die Trächtigkeitsrate bei der transzervikalen Übertragung betrug 38 %, die des endoskopischen Transfers 43 %.

### 5.2.2 Nicht-chirurgischer Transfer von Embryonen

Der erste erfolgreiche Transfer von Pferdeembryonen wurde 1974 von OGURI und TSUTSUMI mit der nicht-chirurgischen Technik durchgeführt (Oguri und Tsutsumi 1974). Dabei wird der Embryo mit Hilfe eines Transfergerätes durch die Zervix hindurch im Uterus plaziert. Hierzu wird die Empfängerstute in einem Untersuchungsstand fixiert und bei Bedarf sediert, die Perianalgegend wird gesäubert. Der Tierarzt sollte einen Armschutz mit sterilem Handschuh tragen. Das Transfergerät wird in die Vagina eingeführt, wobei die Spitze zur Vermeidung von Verletzungen mit den Fingern geschützt wird. Der Zeigefinger wird in der Zervix plaziert und die Spitze des Transfergerätes ungefähr 5 cm in den Uterus geleitet. Dort wird der Embryo deponiert. Der genaue Ort der Embryodeponierung im Uterus dürfte nicht entscheidend für den Erfolg des Transfers sein, da Pferdeembryonen zwischen dem 6. und 16. Tag der Gravidität physiologischerweise durch den gesamten Uterus transportiert werden (Ginther 1983). Nun wird das Transferinstrument wieder entfernt, wobei möglichst vermieden wird, daß große Luftmengen in die Vagina einströmen können. Das Transfergerät wird dann nochmals untersucht, um sicherzustellen, daß der Embryo in den Uterus verbracht wurde (Imel et al. 1981; East et al. 1999).

Als Transfergeräte werden einfache Besamungspipetten (Allen und Rowson 1975; Imel et al. 1981) oder Embryo-Transfer-Pistolen (z.B. „Modell Hannover“ oder Cassou-Pistolette) (Braun und Leidl 1988; Dowsett et al. 1989; Lagneaux und Palmer 1989), in die 0,25 oder 0,5 ml Pailletten eingesetzt werden, benützt. Zum Einführen in die Vagina werden die Transfergeräte mit einem sterilen Plastiküberzug bedeckt, der beim Einführen in die Zervix durchstoßen wird. Mit dieser Methode konnten die Trächtigkeitsraten gegenüber der Methode ohne Plastiküberzug deutlich verbessert werden (54 % gegenüber 23,1 %) (Squires et al. 1982). Um die Gefahr des Embryoverlustes während des Transfers zu minimieren, werden die Pipetten und Pailletten so beladen, daß vor und hinter dem Embryo im Transfermedium durch eine Luftblase getrennt nochmals reines Medium eingefüllt wird (Imel et al. 1981; Dowsett et al. 1989). Als Transfermedium wird beim direkten Transfer modifizierte PBS mit 10 bis 20 % Serum verwendet (Imel et al. 1981; Vogelsang et al. 1985). Dabei kann das Medium auch ein Antibiotikum (Penicillin oder Penicillin + Streptomycin) enthalten oder es wird ein Tropfen des Antibiotikums konzentriert in die Paillette beigefügt (Sertich 1989). Andere Autoren fügen hinter der Schicht reinen Mediums durch eine Luftblase getrennt eine zusätzliche Schicht Medium ein (Savage et al. 1989).

### 5.3 Trächtigkeitsunterstützende Maßnahmen nach dem Transfer

Die Verwendung von Allyl-Trenbolon (Regumate®) zur Synchronisation des Östrus und zum Erhalt der Trächtigkeit bei ovariectomierten Stuten wurde schon im Kapitel „Synchronisation der Spender- und Empfängerstuten“ besprochen. Es kann jedoch auch vorbeugend oder bei Verdacht auf luteale Dysfunktion bei intakten Stuten verwendet werden (Parry-Weeks und Holtan 1987; Darenius et al. 1989). Der Grund für die luteale Dysfunktion wird in Verbindung mit Fehlern bei der maternalen Erkennung der Trächtigkeit gesehen. Die Vorgänge, die zur Erkennung der Trächtigkeit durch das Muttertier führen, sind noch nicht vollständig geklärt. Zum Teil beruht der Prozeß jedoch auf der Blockierung oder Reduktion der  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Ausschüttung durch den Konzeptus während der kritischen Zeit um Tag 14 post ovulationem (Sharp 1980; Sharp und McDowell 1985). DARENIUS und Mitarbeiter (Darenius et al. 1989) verabreichen von Tag 10 bis 72 der Trächtigkeit 27,5 mg Allyl-Trenbolon per os täglich und reduzieren die Dosis dann bis zum Tag 85 auf 0 mg. Die Verabreichung von Allyl-Trenbolon an Empfängerstuten scheint zudem geeignet zu sein, den erforderlichen Grad an Synchronität zwischen Spender und Empfänger auszudehnen (Parry-Weeks und Holtan 1987). Die Versuche wurden an nicht synchronisierten Empfängerstuten durchgeführt. Diese erhielten Allyl-Trenbolon in einer Dosierung von 0,044 mg / kg KGW per os täglich entweder ab dem Tag der Ovulation der Spenderstute oder ab dem Tag der Ovulation der Empfängerstute bzw. ab dem Tag der Luteinisierung des ovulierten Follikels. Stuten im Östrus wurden ab dem Tag der Ovulation der entsprechenden Spenderstute behandelt. Nach nicht-chirurgischem Transfer lag die Trächtigkeitsrate am Tag 30 bei Empfängerstuten, die drei Tage vor bis drei Tage nach der Spenderstute ovulierten bei 77 % (10 von 13). Bei einem Synchronbereich von vier Tagen vor bis sechs Tage nach der Ovulation der Spenderstute lag die Trächtigkeitsrate bei 64 % (16 von 25). Keine Trächtigkeit wurde bei Stuten etabliert, bei denen die Behandlung im Östrus gestartet wurde und bei Empfängerstuten, die fünf oder mehr Tage vor der Spenderstute ovuliert hatten.

Die verfrühte Ausschüttung von  $\text{PGF}_{2\alpha}$  wurde bei Stuten mit Uterusinfektionen beobachtet. Diese beruht auf der Aktivierung der  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Synthese im Endometrium durch den entzündlichen Prozeß und / oder durch das Vorhandensein von Bakterientoxinen (Stabenfeldt et al. 1981). Inhibitoren der Prostaglandin-Synthese, wie z.B. Flunixin-Meglumin, können verwendet werden, um die luteolytischen Effekte der Endotoxine zu verhindern (Daels et al. 1988). Die Verabreichung erfolgt an den Tagen 10 bis 60 der Trächtigkeit in einer Dosierung

von 1,1 mg/kg KGW intravenös. Danach wird eine reduzierte Dosis für weitere 14 Tage verabreicht. Die Behandlung mit Flunixin-Meglumin scheint die Progesteron-Produktion und die Lebensdauer des Corpus luteum nicht zu beeinflussen (Darenius et al. 1989).

VOGELSANG und Mitarbeiter verabreichen nach dem Transfer 500 mg Flunixin-Meglumin und führen eine Operation nach Caslick durch, um die Scheide partiell zu verschließen. Zusätzlich erhalten die Stuten nach dem Transfer für zehn Tage 22 mg Allyl-Trenlolon (Regumate®) per os täglich. Im Falle einer Trächtigkeit wird diese Behandlung bis zum Tag 50 der Trächtigkeit fortgeführt. Dann erhalten die Stuten dieselbe Dosis jeden zweiten Tag bis zum Tag 100 der Trächtigkeit (Vogelsang et al. 1985; Vogelsang und Vogelsang 1989).

## **5.4 Faktoren, die die Trächtigkeitsrate beeinflussen**

Die Trächtigkeitsrate wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Hierzu gehören die Jahreszeit, die Art des Transfers, die Synchronität zwischen Spender und Empfänger, die Qualität der Empfängerstute, das Alter der Spenderstute und die Qualität der Embryonen (McKinnon und Squires 1988; Squires et al. 1999; McCue et al. 2001). Zwischen den Tagen 12 bis 50 der Gestation lag die frühembryonale Mortalität bei 15,5 % ( 65 von 419 ). Während dieser Zeitspanne war die Wahrscheinlichkeit des Trächtigkeitsverlustes durch frühembryonalen Tod zwischen den Tagen 17 bis 25 am größten (Carnevale et al. 2000).

### **5.4.1 Jahreszeit**

In den frühen Untersuchungen hatte die Jahreszeit enormen Einfluß auf die Trächtigkeitsraten in Embryotransferprogrammen. Unabhängig von der Art des Transfers konnten zwischen März und Juni deutlich weniger Trächtigkeiten etabliert werden als zwischen Juli und September (Trächtigkeitsrate 6 % gegenüber 37 %) (Squires et al. 1982). In einer späteren Studie zeigte sich, daß die Jahreszeit zwar Einfluß auf den Erfolg des nicht-chirurgischen Transfers hatte, die Trächtigkeitsraten nach chirurgischem Transfer davon jedoch unbeeinflusst blieben (Iuliano et al. 1985). Das Fehlen des saisonalen Einflusses wurde auf ein besseres Management der Stuten zurückgeführt. Diese wurden ab dem ersten Dezember einem 16-Stunden Lichtprogramm zugeführt, um den Beginn der Zuchtsaison zu

beschleunigen. Zudem wurden nur solche Stuten als Empfänger verwendet, von welchen in der vorherigen Zuchtsaison bei zwei Embryogewinnungsversuchen mindestens ein Embryo gewonnen werden konnte. Auch hat es den Anschein, daß die Stuten mehr als einen Zyklus vor dem Transfer eines Embryos durchlaufen haben sollten. Unabhängig davon bleibt anzumerken, daß die Trächtigkeitsraten während der Monate Juli und August generell am höchsten sind (McKinnon und Squires 1988).

#### **5.4.2 Transfermethode**

Wie bereits oben beschrieben, werden durch den chirurgischen Transfer von Embryonen wesentlich konstantere und etwas höhere Trächtigkeitsraten erzielt als durch die nicht-chirurgische Methode. Bei dieser variieren die Angaben zwischen 16 % (Riera und McDonough 1993) und 71 % (Allen und Rowson 1975; Wade et al. 1987). Zu den Gründen, die zu den leicht erniedrigten Trächtigkeitsraten nach transzervikalem Transfer führen könnten, gehören: 1.) Beschädigung des Embryonen während des Transfers, 2.) die Induktion geringgradiger Uterusinfektionen durch bakterielle Kontamination, 3.) Verletzungen durch das Transferinstrument, 4.) Deponierung des Embryonen im Uteruskörper anstatt im Uterushorn, 5.) durch die zervikale Stimulation ausgelöste, Prostaglandin-medierte Kontraktionen des Uterus, die zur Ausstoßung des Embryonen führen (McKinnon und Squires 1988; Biven et al. 1989). Die Trächtigkeitsraten bei der chirurgischen Übertragung liegen zwischen 69 % (Squires et al. 1982) und 80 % (Iuliano et al. 1985). Unterschiedliche Angaben gibt es über den Erfolg bei der Übertragung des Embryonen in das zur Ovulation kontralaterale Uterushorn. Die Trächtigkeitsrate war bei dem Transfer in das kontralaterale Uterushorn mit 54,2 % deutlich niedriger als beim Transfer in das ipsilaterale Horn mit 82,5 % (McKinnon und Squires 1988). Man nahm an, daß, trotz der physiologischen Wanderung des frühen Pferdeembryonen im Uterus, ein lokaler Effekt von Progesteron in dem zur Ovulation ipsilateralen Horn auf den Embryo direkt nach dem Transfer günstige Auswirkungen hat. In anderen Untersuchungen konnte dagegen kein Unterschied in der Trächtigkeitsrate festgestellt werden. Diese lag bei dem Transfer in das ipsilaterale Uterushorn bei 79,1 %, bei dem Transfer in das kontralaterale Horn bei 77,8 % (Fleury et al. 1989).



### **5.4.3 Synchronität zwischen Spender und Empfänger**

Die Synchronität zwischen Spender und Empfänger ist für den Erfolg eines Embryotransferprogrammes von großer Bedeutung. Als zyklussynchron werden Empfängerstuten bezeichnet, die einen Tag vor (+1) bis drei Tage nach (-3) der Spenderstute ovulieren (McKinnon et al. 1988; Squires und Seidel 1995). Innerhalb dieser Zeitspanne hat der Grad der Synchronität zwischen Spender und Empfänger nur unwesentlichen Einfluß auf die Trächtigkeitsrate (siehe auch Kapitel „Synchronisation der Spender- und Empfängerstuten“).

### **5.4.4 Alter der Spenderstute**

Embryonen, die von älteren Stuten gewonnen werden, zeigen einen höheren Prozentsatz an frühembryonaler Mortalität als Embryonen von jüngeren Stuten. Die Abortrate zwischen Tag 4 und 14 post ovulationem liegt für junge, fertile Stuten bei nur 9 %, während sie für ältere, subfertile Stuten 62 % erreicht (Ball et al. 1989). BALL und Mitarbeiter übertrugen vier Tage alten Embryonen, die aus dem Eileiter von jungen, fertilen und alten, subfertilen Stuten gewonnen wurden, in den Uterus fertiler Stuten. Die Trächtigkeitsrate am Tag 14 (= 14 Tage nach der Ovulation der Spenderstute) war für die Embryonen von älteren, subfertilen Stuten geringer als für jene aus fertilen Stuten (23 % gegenüber 52 %). Die Kombination von niedriger Embryogewinnungsrate und hoher Abortrate nach dem Transfer der Embryonen von älteren, subfertilen Stuten reduziert deutlich die Anzahl von Fohlen, die von diesen Stuten gewonnen werden können.

### **5.4.5 Qualität der Embryonen**

Die Qualität der Embryonen steht in einer direkten Beziehung zur Trächtigkeitsrate. Embryonen können in vier bzw. fünf Qualitätsgrade eingeteilt werden (Grad 1 = sehr gut, Grad 4 = schlecht). Dabei werden die morphologische Beurteilung, die Größe und das Entwicklungsstadium des Embryonen berücksichtigt. Ab einer Bewertung mit Grad 3 ist die Trächtigkeitsrate deutlich geringer als für Embryonen, die mit Grad 1 oder 2 bewertet wurden (McKinnon und Squires 1988; Carney et al. 1991; Ball et al. 1993). Auch bei Embryonen mit

nur geringen morphologischen Veränderungen, die mit Grad 2 beurteilt wurden, konnte in einer Untersuchung eine höhere Rate an Trächtigkeitsverlusten festgestellt werden als bei Embryonen mit der Beurteilung Grad 1. In derselben Studie wurde die verzögerte Entwicklung bei Embryonen in direktem Zusammenhang mit späteren Trächtigkeitsverlusten gesehen. Embryonen, die bei der ersten Trächtigkeitsuntersuchung fünf Tage nach dem Transfer (ungefähr Tag 12 der Gestation) mit Ultraschall dargestellt werden konnten, resultierten in deutlich weniger Trächtigkeitsverlusten als Embryonen, die erst bei späteren Untersuchungen (sieben bis neun Tage nach dem Transfer) zum ersten Mal durch Ultraschall dargestellt werden konnten. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß Embryonen, die bei der ersten Trächtigkeitsuntersuchung nicht dargestellt werden können, zu klein sind und damit unter der Normalgröße liegen (Carnevale et al. 2000). Die Angaben über die Trächtigkeitsrate von Grad 3 klassifizierten Embryonen am Tag 50 variieren zwischen 17 % (McKinnon und Squires 1988) und 46 % (Squires et al. 1992). Die Trächtigkeitsraten nach dem Transfer von frischen oder gekühlt transportierten Embryonen der Klasse 1 sind ungefähr gleich (Trächtigkeitsrate am Tag 50 nach chirurgischem Transfer frischer Embryonen 67,8 %, gekühlter Embryonen 63,2 %) (Squires et al. 1999; McCue et al. 2001). Die Trächtigkeitsrate bei Verwendung tiefgefrierkonservierter Embryonen liegt mit 50 % etwas niedriger (Squires et al. 1999).

## **5.5      Schlußfolgerung**

Die sorgfältige Auswahl der Empfängerstuten ist ein wichtiger Faktor bezüglich des Erfolges eines Embryotransferprogrammes. Die Stuten sollten eine gute körperliche Entwicklung zeigen und einen physiologischen gynäkologischen Status. Der Transfer kann entweder chirurgisch von der Flanke aus oder nicht-chirurgisch (transzervikal) erfolgen. Für den chirurgischen Transfer spricht die relativ konstante Trächtigkeitsrate von 69 % bis 80 % . Er wird hauptsächlich beim kommerziellen Embryotransfer eingesetzt. Die Vorteile des transzervikalen Transfers sind die geringe Invasivität und die niedrigen Kosten. Nachteile sind eine größere Variation der Trächtigkeitsraten. Faktoren, die die Trächtigkeitsrate beim Embryotransfer beeinflussen sind die Jahreszeit, die Art des Transfers, die Synchronität zwischen Spender und Empfänger, die Qualität der Empfängerstute, das Alter der Spenderstute und die Qualität der Embryonen.

## **6. Kühlung und Transport von Embryonen**

Die Möglichkeit, gewonnene Embryonen zu transportieren, bietet viele Vorteile. So wird die Notwendigkeit, Spender- und Empfängerstuten am gleichen Ort zu halten, überflüssig, wodurch Kosten reduziert werden können. Die Empfängerstuten können in zentralen Einrichtungen untergebracht werden, was den Aufwand an Personal und Ausrüstung minimiert. Zudem können die gewünschten Embryonen sowohl national als auch international geliefert werden (Carnevale et al. 1987).

### **6.1 Kulturmedien und Lagerungsbedingungen**

Bisher wurden verschiedene Kulturmedien und Lagerungsbedingungen getestet. ALLEN und Mitarbeiter benützten die Eileiter von Kaninchen zum Transport von Pferdeembryonen von England nach Polen. Nach einem 40 bis 49 stündigen Transport resultierten drei von vier Embryonen in Trächtigkeiten nach dem Transfer (Allen et al. 1976). Sechs Tage alte Embryonen, die vor dem transzervikalen Transfer für 29 bis 70 Minuten in physiologischer Kochsalzlösung + 2 % Gelatine oder in Kochsalzlösung mit Stutenserum bei 30°C gelagert wurden, zeigten nach dem Transfer dieselben Trächtigkeitsraten (40 %)(Oguri und Tsutsumi 1974). Die Lagerung von Embryonen in Tissue Culture Medium (TCM-199) bei 30°C für 20 bis 55 Minuten resultierte nach dem chirurgischen Transfer von 16 Embryonen in sieben Trächtigkeiten und nach transzervikalem Transfer von sieben Embryonen in fünf Trächtigkeiten (Allen und Rowson 1975). In einer späteren Untersuchung kam es dagegen bei der Verwendung von TCM-199 bei 12 Embryonen zu keiner Trächtigkeit, während beim Einsatz von Dulbecco's phosphate buffered saline (D- PBS) aus zehn übertragenen Embryonen sechs Trächtigkeiten hervorgingen (Douglas 1980).

#### **6.1.1 Dulbecco's phosphate buffered saline**

Bei der direkten Übertragung werden die Embryonen heute üblicherweise in D-PBS mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) gelagert und innerhalb von zwei Stunden übertragen (McKinnon und Squires 1988). Die Lagerung für sechs Stunden (Douglas 1980) oder 24 Stunden (Imel 1981) bei Raumtemperatur reduzierte die Trächtigkeitsraten. Um den Transport der

Pferdeembryonen über längere Distanzen zu ermöglichen, ist jedoch ein System notwendig, das die Lebensfähigkeit der Embryonen für 12 bis 24 Stunden erhält. PASHEN lagerte Embryonen in D-PBS mit 10 % FCS bei 4°C für 24 bis 36 Stunden mit nur geringen Verlusten an Lebensfähigkeit (Pashen 1986). Durch die Kühlung wurde die Weiterentwicklung der Embryonen temporär gehemmt. Basierend auf der morphologischen Beurteilung überlebten alle Embryonen die Kühlung für 48 Stunden und 77 % überlebten die Kühlung für 84 Stunden und entwickelten sich *in vitro* weiter. Vier transzervikal übertragene Embryonen resultierten in zwei Trächtigkeiten. Die Verwendung von Dulbecco's PBS + 1 % Kälberserum + 0,4 % bovines Serumalbumin als Kühl- und Lagerungsmedium bei 4-6°C für 24 Stunden resultierte bei 16 übertragenen Embryonen in drei lebenden Fohlen. Weitere 16 Embryonen wurden direkt übertragen (Kontrollgruppe) woraus fünf lebende Fohlen gewonnen werden konnten (Sertich et al. 1988).

### 6.1.2 Ham's F 10

Die Herstellung des Ham's F 10 Mediums erfolgt durch die Mischung von destilliertem Wasser mit einer kommerziell erhältlichen Vormischung für das Medium, Natriumbicarbonat (1,2 g), Penicillin ( $10^5$  IU / l) und Streptomycinsulfat (0,05 g / l). Der pH wird auf 7,35 bis 7,5 eingestellt, bevor die Mischung mit einem Stickstoff-Drucksystem gefiltert wird. Das filtrierte Medium kann bei 4°C in sterilen Röhrchen bis zu 30 Tage gelagert werden. Vor dem Gebrauch wird es auf 37°C erwärmt und für drei bis fünf Minuten mit einer Mischung aus 5 % CO<sub>2</sub>, 5 % O<sub>2</sub> und 90 % N<sub>2</sub> begast. Das fetale Kälberserum wird vor der nochmaligen Filtration durch einen Filter mit der Porenweite von 0,22 µm hinzu gegeben. Um die Stabilität des begasten Mediums zu erhalten, wird es durch eine Schutzschicht (Parafilm®) von der Raumluft getrennt. Die Embryonen werden innerhalb einer Stunde nach der Gewinnung gewaschen und in das Transportmedium überführt und mit etwas Medium in Pailletten aufgezogen. An beiden Enden wird die Paillette in direktem Kontakt mit dem Medium durch Paraffinöl verschlossen, um den durch die Begasung herbeigeführten reduzierten Sauerstoffgehalt zu erhalten. Zusätzlichen Schutz vor einem Trauma oder vor dem Verlust des Embryonen bietet die Platzierung der Paillette in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen, das mit demselben Medium gefüllt wird. Ausserdem wird ein Röhrchen mit Dulbecco's PBS mit 10 % FCS gekühlt mitgeliefert, welches nach dem Transport zur Waschung des Embryonen und als Transfermedium dient. Häufig wird ein kommerziell erhältlicher Container zur

Kühlung von Hengstsamen (Equitainer®) verwendet. Dieser Container bewirkt eine Kühlrate von 0,3°C / Minute und garantiert eine konstante Temperatur von +5°C über 24 Stunden. Vor dem Transfer werden die Embryonen in eine mit gekühlter modifizierter PBS gefüllte Petrischale eingebracht und nochmals „gewaschen“ (Carnevale et al. 1987). Heute wird fast ausschließlich die von CARNEVALE und Mitarbeitern entwickelte Methode zur Kühlung und zum Transport von Embryonen in Ham's F 10 mit reduziertem Sauerstoffgehalt verwendet

Durch die mikrochirurgische Teilung von fünf Embryonen und der Lagerung von jeweils einem Teil bei 37°C in D-PBS mit 10 % FCS oder in dem Zellkulturmedium Ham's F 10 mit 10 % FCS in einer Atmosphäre von 5 % CO<sub>2</sub> in Luft konnten Ergebnisse gewonnen werden, die auf eine bessere Eignung von Ham's F 10 zur Lagerung von Embryonen hinwiesen (Slade et al. 1984). Um die Embryonen bei einem reduzierten Sauerstoffgehalt lagern zu können, wird Ham's F10 mit 10 % FCS mit einer Mischung aus 5 % CO<sub>2</sub>, 5 % O<sub>2</sub> und 90 % N<sub>2</sub> begast. Die 24 stündige Lagerung wurde vergleichend auch mit weiteren Embryonen in Minimal Essential Medium (MEM) mit Hank's balanced salts und 10 % FCS bei 24°C und in MEM bei 5°C durchgeführt. Die Qualität der Embryonen, die in Ham's F 10 bei reduziertem Sauerstoffgehalt gelagert wurden, war besser als jene aus den anderen Medien (Clark et al. 1987). Zudem wurde die Lebensfähigkeit von Embryonen in Ham's F 10 bei unterschiedlichen Temperaturbedingungen getestet. Die Lagerung erfolgte für 12 h bei 5°C, 24°C oder 37°C und danach noch einmal 12 h bei 37°C. Embryonen, die bei 5°C oder 24°C gelagert wurden, entwickelten sich während der ersten 12 h im Gegensatz zu den bei 37°C gelagerten nicht weiter, taten dies jedoch während der folgenden 12 Stunden bei 37°C. Die Trächtigkeitsraten für übertragene Embryonen, die für nur eine Stunde oder bis zu 12 Stunden bei 24°C in Ham's F 10 gelagert worden waren, waren nahezu identisch. Die Lebensfähigkeit für in Ham's F 10 gelagerte Embryonen konnte in diesem Versuch also für 12 Stunden erhalten werden.

Da die Herstellung des mit reduzierter Sauerstoffsättigung behandelten Ham's F 10 Mediums unter Praxisbedingungen sehr aufwendig ist, wurde die Verwendbarkeit eines nicht begasten Ham's F 10 Mediums mit HEPES-Puffer getestet (Carnevale et al. 1987). Die Embryonen wurden hierzu in einem der beiden Medien bei 5°C für 24 Stunden gelagert. Unabhängig von der Art des Mediums entwickelten sich die Embryonen während der Kühlphase nicht weiter. Embryonen, die im begasten Ham's F 10 Medium gelagert wurden, hatten nach der Lagerung eine bessere Qualität, wobei die Embryonen beider Medien innerhalb der Qualitätsgrade 1 und 2 eingestuft wurden, und zeigten im Durchschnitt ein

besseres Wachstum als die Embryonen in Ham's F 10 mit HEPES-Puffer. Auch die Trächtigkeitsraten am Tag 14 und 35 der Gestation waren für die Embryonen des begasten Mediums besser (70 %, 55 %) als für die Embryonen des unbegasten HEPES-gepufferten Mediums (20 %, 15 %).

## **6.2 Morphologische Veränderungen der Embryonen nach Kühlung und Lagerung**

Morphologische Veränderungen nach 24 stündiger Lagerung bei 5°C beinhalteten: 1.) Partieller oder totaler Kollaps der Blastocoele mit Trennung von der Zona pellucida oder der azellulären Kapsel, 2.) Einschnitte von isolierten Gebieten des Trophoblasten, 3.) ausgestoßene Blastomeren, 4.) verdunkelte Zellen und 5.) vermehrt körniges Aussehen der Oberfläche mit augenscheinlicher Separation von Zellen. Fünf der sechs kleinsten Embryonen (< 300 µm) hatten nach der Kühlung eine kollabierte Blastocoele, während davon nur einer von 34 größeren Embryonen (> 300 µm) betroffen war (Carnevale et al. 1987). Dies unterstützt die Ergebnisse einer anderen Untersuchung, in welcher demonstriert werden konnte, daß kleinere Pferdeembryonen (< 175 µm) anfälliger für die schädigenden Effekte der Kühlung sind als größere Embryonen (Clark et al. 1987). Isolierte Trophoblastzellen wurden dagegen eher bei größeren Embryonen (Durchmesser um die 800-900 µm) festgestellt. Häufiger resultierte der Kühlungsprozess allerdings in einer geringen Anzahl ausgestoßener Blastomeren oder im Vorhandensein verdunkelter Zellen, was zelluläre Beschädigung oder zellulären Tod vermuten läßt (Carnevale et al. 1987). Allerdings glaubt man, daß erst eine größere Anzahl von Blastomeren als Indikator für eine Degeneration des Embryonen herangezogen werden kann (Slade et al. 1984). Bei vielen Embryonen wurde ein sehr körniges Aussehen der Oberfläche beobachtet, was durch eine Schädigung der tight junctions verursacht werden könnte (Clark et al. 1987).

## **6.3 Trächtigkeitsraten nach Kühlung und Lagerung in Ham's F 10**

Die Kühlung und Lagerung von Embryonen in begastem Ham's F 10 für 24 Stunden scheint die Lebensfähigkeit der Embryonen nicht zu beeinflussen. Werden Embryonen gleicher Qualität verwendet, sind die Trächtigkeitsraten von sofort übertragenen und gekühlt gelagerten Embryonen nahezu gleich. Die Trächtigkeitsrate am Tag 14 der Trächtigkeit lag

für die Kontrollgruppe und für gekühlt gelagerte Embryonen bei 90 % bzw. 70 % und am Tag 35 betrug die Trächtigkeitsrate 80 % bzw. 55 %. Die frühembryonale Mortalität bis zum Tag 35 lag somit bei den gekühlten Embryonen etwas höher (3 von 14) als bei den frisch übertragenen (2 von 18). Es wird vermutet, daß die innere Zellmasse während der Kühlung leichter beschädigt wird, da das Wachstum des Trophoblasten ohne andauerndes embryonales Wachstum stattfand (Carnevale et al. 1987). Die von COOK angegebenen Trächtigkeitsraten für gekühlt gelagerte und frische Embryonen am Tag 15 der Gestation betrugen 20 von 24 (83,3 %) und 20 von 26 (76,9 %), am Tag 50 betrugen sie 18 von 24 (75 %) und 17 von 26 (65,4 %). Die frühembryonale Mortalität zwischen Tag 15 und 30 lag somit für gekühlt gelagerte Embryonen bei 8,2 % und für frisch übertragene bei 11,5 % (Cook et al. 1989). Ähnliche Trächtigkeitsraten konnten auch in der Untersuchung von CARNEY und Mitarbeitern erreicht werden (Carney et al. 1991). Der pH des Ham's F 10 Mediums nach der Lagerung scheint dabei keinen Einfluß auf die Trächtigkeitsrate zu haben. Die meisten Medien hatten einen pH von 7,1 bis 7,3, es wurden jedoch Extremwerte zwischen 6,59 und 8,05 gemessen. Die frühembryonale Mortalität zwischen Tag 12 und 35 war insgesamt für frisch übertragene und gekühlte Embryonen gleich, jedoch größer für Embryonen, die über 12 Stunden gelagert wurden (25 %), als für Embryonen mit einer Lagerungszeit von unter 12 Stunden (10 %).

Bei der Kühlung von Embryonen für 36 Stunden nimmt zwar die Qualität der Embryonen leicht ab, die Trächtigkeitsraten waren jedoch verglichen mit für 18 Stunden gekühlten Embryonen am Tag 14 der Gestation gleich (40 % gegenüber 36,6 %) (Martin et al. 1991). In einer weiteren Untersuchung wurden die Embryonen vor dem Transfer bis zu 30 Stunden gekühlt. Es konnte kein Unterschied bezüglich der Trächtigkeitsraten von 12 Stunden gegenüber 24 bis 30 Stunden gelagerten Embryonen festgestellt werden. Die Trächtigkeitsraten am Tag 50 der Gestation lagen für frisch übertragene Embryonen bei 67,8 % und für gekühlte Embryonen bei 63,2 % (Squires et al. 1999). Einen Überblick über die verschiedenen Ergebnisse bezüglich der Trächtigkeitsraten gibt Tabelle 8.

Die Embryonen können nach ihrem Entwicklungsstadium in vier Klassen eingeteilt werden: Morula, frühe Blastozyste, Blastozyste und expandierende Blastozyste. Das Entwicklungsstadium zum Zeitpunkt des Transfers beeinflusste die Trächtigkeitsraten bei gelagerten Embryonen, nicht jedoch bei direkt übertragenen Embryonen. Kultivierte Embryonen, die sich nicht bis zu einem Entwicklungsstadium der frühen Blastozyste oder Blastozyste weiterentwickelt hatten, konnten keine Trächtigkeit etablieren (0 von 7), während acht von neun Embryonen mit einem Entwicklungsstadium der frühen bis expandierten

Blastozyste in einer Trächtigkeit resultierten. Das durchschnittliche Entwicklungsstadium für gelagerte Embryonen, die in einer Trächtigkeit resultierte, war das Stadium der Blastozyste, während sich Embryonen, die keine Trächtigkeit etablieren konnten, meist im Stadium der Morula befanden (Clark et al. 1987).

Die Darstellung des Konzeptus in der Frühgravidität mittels Ultraschall gelang bei gekühlten Embryonen meist erst etwas verzögert. Die Größe dieser Embryonen war etwas kleiner als jene direkt übertragener Embryonen. Mit Ultraschall darstellbare Merkmale sich normal entwickelnder Embryonen waren erst mit Verzögerung sichtbar (Carnevale et al. 1987; McKinnon et al. 1987). Diese Beobachtung könnte durch das verzögerte Wachstum während der gekühlten Lagerung erklärt werden. Beobachtungen an Kaninchenembryonen lassen vermuten, daß der Lagerung bei kühlen Temperaturen eine verlangsamte Entwicklungsperiode folgt (Hughes und Anderson 1982). Im Gegensatz zu den Ergebnissen von CARNEVALE war die Größe der Embryonen an den Tagen 11, 14 und 30 der Gestation in anderen Untersuchungen bei frischen und gekühlt gelagerten Embryonen allerdings gleich (Cook et al. 1989).

**Tabelle 8:** Trächtigkeitsraten von frischen und gekühlt gelagerten Embryonen verschiedener Untersucher

Gestations- tag	Trächtigkeitsrate in %					
	12-15		35		50	
Untersucher	frisch	gekühlt	frisch	gekühlt	frisch	gekühlt
Carnevale (Carnevale et al. 1987)	90	70	80	55		
Cook (Cook et al. 1989)	76,9	83,3			65,4	75
Carney (Carney et al. 1991)	73,8	78,8	60,8	66,5	58	64,5
Squires (Squires et al. 1999)					67,8	63,2



## **6.4      Schlußfolgerung**

Die Kühlung und der Transport von Embryonen bietet viele Vorteile bezüglich des Managements der Spender- und Empfängerstuten, des Personals und der benötigten Ausrüstung und hilft so, Kosten zu sparen. Heute wird als Kühl-und Transportmedium fast ausschließlich mit 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> und 90% N<sub>2</sub> begastes Ham's F 10 Medium verwendet. Die gekühlte Lagerung von Embryonen für 24 bis 30 Stunden scheint die Lebensfähigkeit der Embryonen nicht oder nur geringfügig zu beeinflussen.

## **7. Kryokonservierung von Embryonen**

Die erste Trächtigkeit, die mit einem kryokonservierten Embryo etabliert werden konnte, wurde 1981 beschrieben (Griffin et al. 1981). Von 19 eingefrorenen Embryonen wurden vier übertragen, wobei eine Stute trächtig wurde, die jedoch zwischen dem 60. und 85. Tag der Gestation abortierte. Über die angewandte Methode zur Kryokonservierung wurde nicht berichtet. Ein japanisches Team berichtete 1982 über die Geburt eines Fohlens nach dem Transfer eines für zwei Tage kryokonservierten sechs Tage alten Embryos; nur drei von insgesamt elf transferierten Embryonen resultierten in einer Trächtigkeit, in zwei Fällen kam es zu einem Abort (Yamamoto et al. 1982). Heute können nach dem Transfer von kryokonservierten Embryonen Trächtigkeitsraten von ungefähr 50 % erreicht werden (Squires et al. 1999).

### **7.1 Prinzipien der Kryokonservierung**

#### **7.1.1 Konventionelle Kryokonservierung**

Die Prinzipien der Kryokonservierung sind für alle Zellen gleich (Seidel 1988). Bei der konventionellen Kryokonservierung ist es notwendig, einen Großteil des Wassers aus den Zellen zu entfernen, bevor es zur intrazellulären Eisbildung kommt. Falls eine solche Dehydrierung nicht erfolgt, kommt es zur Bildung großer intrazellulärer Eiskristalle, welche die Zellen schädigen können. Das Wasser kann durch eine langsame Abkühlung osmotisch aus den Zellen entfernt werden. Die Embryonen befinden sich in einem Medium (D-PBS mit einem Kryoprotektivum), in dem anfangs Wasser extrazellulär durch Eiskristallbildung gefriert. Diese Kristalle bestehen aus reinem Wasser, zwischen denen sich das Restwasser mit der nun höheren Konzentration gelöster Substanzen (hauptsächlich NaCl und das Kryoprotektivum) befindet. Dieses hyperosmotische Medium zwischen den Eiskristallen führt zum osmotischen Verlust der Zellen an Wasser. Wird der Kühlungsprozeß langsam genug, mit einer Abkühlrate von ungefähr  $0,5^{\circ}\text{C} / \text{min}$  für Embryonen, durchgeführt, wird mit der Zunahme der extrazellulären Eiskristalle und der dadurch steigenden Osmolarität des Restmediums mehr und mehr Wasser aus den Zellen gezogen. Werden die Embryonen zu schnell abgekühlt, gefriert das intrazelluläre Wasser in den Zellen durch Eiskristallbildung

und schädigt diese. Werden die Embryonen dagegen zu langsam abgekühlt, werden sie über einen zu langen Zeitraum stark hyperosmotischen Bedingungen des Mediums ausgesetzt, was in einer starken Schrumpfung und Schädigung der Embryonen endet. Diese Erscheinung wird als „Lösungseffekt“ bezeichnet. Wird die richtige Abkühlrate eingehalten, werden sowohl die Bildung großer Eiskristalle als auch der Lösungseffekt minimiert (Seidel 1989; Seidel 1996).

Der Gefrierpunkt der verwendeten Medien inklusive der Standardmengen an Kryoprotektiva beträgt ungefähr  $-3^{\circ}\text{C}$ . Beim Einfrieren kann es zum sogenannten „supercooling“ kommen, wobei das Medium spontan erst bei Temperaturen deutlich unter dem eigentlichen Gefrierpunkt gefriert. Deshalb wird die Eisbildung unterhalb des Gefrierpunktes, etwa bei  $-6^{\circ}\text{C}$ , durch das sogenannte „seeding“ induziert. Dabei wird die Wand des den Embryo enthaltenden Gefäßes mit einer Metallzange, die in flüssigem Stickstoff gekühlt wurde, berührt. Durch diesen Vorgang wird die Eiskristallbildung induziert.

Um die Überlebensfähigkeit der Zellen bei der Kryokonservierung zu verbessern, werden dem Gefriermedium Kryoprotektiva zugesetzt. Die Kryoprotektiva können in zwei Klassen eingeteilt werden: nicht permeable, extrazellulär wirkende Kryoprotektiva wie z.B. Zuckermoleküle (Saccharose) oder Proteine (Serumalbumin) und permeable, intrazellulär wirkende Kryoprotektiva wie z.B. Dimethylsulfoxid (DMSO), Glyzerin, 1,2-Propandiol (Propylenglykol) und Ethylenglykol. In vielen Fällen werden sowohl extra- als auch intrazelluläre Kryoprotektiva verwendet, wobei den intrazellulären größere Bedeutung zukommt. Die Konzentration der permeablen Kryoprotektiva im Medium ist ungefähr fünf mal höher als die Konzentration der anderen Moleküle zusammen im Medium und intrazellulär. Obwohl die Kryoprotektiva die Zellmembran relativ schnell durchdringen, ist die Permeabilität für Wasser noch besser, so daß zunächst Wasser aus den Zellen ausströmt, um die extrazellulär höhere Osmolarität zu verdünnen. Sobald das Kryoprotektivum in die Zelle gelangt strömt Wasser nach und die ursprüngliche Zellgröße wird wieder hergestellt. Diese initiale Schrumpfung scheint die Embryonen nicht zu schädigen, kann durch die Zugabe des Kryoprotektivums in mehreren Schritten jedoch minimiert werden.

Die Entfernung der penetrierenden Kryoprotektiva nach dem Auftauen stellt dagegen ein ernsthaftes Problem dar, da die Zellen bei diesem Vorgang sehr leicht beschädigt werden können. Werden die Embryonen einfach in ein Medium ohne Kryoprotektivum gegeben oder direkt auf die Empfängerstute übertragen, strömt durch die intrazellulär höhere Osmolarität (hohe intrazelluläre Konzentration des Kryoprotektivums) Wasser ein. Bevor das Kryoprotektivum aus der Zelle herausdiffundieren kann, schwillt diese an und es kommt zur

Lysis der Zelle. Die Entfernung des Kryoprotektivums aus den Zellen kann auf zwei Arten erfolgen. Eine Möglichkeit besteht darin, das Kryoprotektivum in kleinen Schritten zu verdünnen. Dies führt zu einer geringen Anschwellung der Zellen bei jedem Schritt, bis sich nach etwa fünf Minuten ein Ausgleich der unterschiedlichen Osmolaritäten ereignet hat. Eine Beschädigung der Zellen ist durch diese Anschwellung nicht zu erwarten. Die andere Möglichkeit besteht darin, die Embryonen in ein Medium mit einer relativ hohen Konzentration einer nicht-penetrierenden Substanz, z.B. Saccharose, zu geben. Diese veranlaßt Wasser aus den Zellen zu diffundieren, wodurch das einströmende Wasser ausgeglichen wird. Schließlich beginnt jedoch das Kryoprotektivum aus den Zellen in das Medium zu diffundieren, wodurch es zu einer Schrumpfung der Zellen kommt, was kleine Schäden verursachen kann. Nachdem die Zellen aus dem Medium mit der nicht-penetrierenden Substanz entfernt werden, erreichen sie wieder ihre ursprüngliche Größe (Leibo 1984; Schneider und Mazur 1984). Die beiden Methoden zur Entfernung des Kryoprotektivums können auch kombiniert angewendet werden (Seidel 1989; Seidel 1996).

### **7.1.2 Vitrifikation**

Bei der Vitrifikation (ultraschnelles Einfrieren) werden die Embryonen direkt in flüssigen Stickstoff eingetaucht. Hierzu werden sehr hohe Konzentrationen eines penetrierenden Kryoprotektivums benötigt, die Konzentration liegt bei 5 mol / Liter oder höher. Dadurch nimmt die extra- und intrazelluläre Flüssigkeit beim Kühlen an Viskosität zu, sie erstarrt, ohne Eiskristalle zu bilden. Diese fehlende Eiskristallbildung ist der größte Vorteil der Vitrifikation. Zudem entfällt die langsame Abkühlung in teuren Apparaten. Ein Nachteil ist die hohe Konzentration an Kryoprotektiva, die benötigt wird. Diese kann auf Embryonen toxisch wirken. Die Toxizität wird minimiert, indem die Kontaktzeit zwischen Embryo und Kryoprotektivum vor dem Einfrieren minimiert wird und indem das Kryoprotektivum erst zu den schon abgekühlten Embryonen zugegeben wird. Auch die Entfernung des Kryoprotektivums nach dem Auftauen ist problematisch. Meist wird es relativ schnell unter Verwendung von Saccharose entfernt. Ein wichtiger Punkt bei der Vitrifikation besteht in der extra- und intrazellulär unterschiedlichen Konzentration an Kryoprotektivum. Die Embryonen werden eingefroren, bevor es zum Konzentrationsausgleich gekommen ist, die intrazelluläre Konzentration des Kryoprotektivums entspricht in etwa jener der konventionellen Kryokonservierung (Seidel 1996).

## 7.2 Durchführung der Kryokonservierung

### 7.2.1 Alter und Größe der Embryonen

Nach dem Transfer in Empfängerstuten konnten sich drei von elf Embryonen, die am Tag 6 ihrer Entwicklung unter Verwendung von Glycerin eingefroren worden waren, weiterentwickeln, ein lebendes Fohlen wurde geboren; acht Tage alte Embryonen, die in gleicher Weise kryokonserviert wurden, überlebten den Vorgang dagegen nicht (Yamamoto et al. 1982). Die Vermutung, daß kleinere Embryonen die Tiefkühlkonservierung besser überstehen als größere Embryonen, konnte von anderen Untersuchern bestätigt werden. Sechs und sieben Tage alte Embryonen wurden mit Glycerin in Glasampullen kryokonserviert; vier der sechs Tage alten Embryonen wurden chirurgisch von der Flanke aus in drei Empfängerstuten übertragen, zwei der drei Empfängerstuten brachten ein lebendes Fohlen zur Welt (Takeda et al. 1984). SLADE und Mitarbeiter verglichen die Wirkung unterschiedlicher Kühlverfahren auf die Lebensfähigkeit der Pferdeembryonen (Slade et al. 1984). Dabei wurden 23 sechs Tage alte Embryonen eingefroren, von denen 17 nach dem Auftauen in eine Empfängerstute chirurgisch transferiert werden konnten. Am Tag 50 der Gestation lag die Trächtigkeitsrate bei 53 % (9 von 17). Dabei war die Trächtigkeitsrate der vorher als frühe Blastozyste klassifizierten Embryonen mit 62 % höher als die der expandierten Blastozysten mit 10 %. Weitere Untersucher bestätigen, daß sich die Embryonen im Stadium der Morula oder frühen Blastozyste besser zur Kryokonservierung eignen (Boyle und Allen 1985; Seidel et al. 1989; Lagneaux und Palmer 1991; Meira et al. 1993; Poitras et al. 1994).

Der Grund für die schlechte Überlebensfähigkeit der größeren Pferdeembryonen bei der Kryokonservierung ist noch nicht vollständig geklärt. Die Oberfläche der Embryonen wird im Verhältnis zum Volumen umso kleiner, je größer die Embryonen werden. Bei gleichen Rahmenbedingungen benötigt das Kryoprotektivum bei größeren Embryonen dementsprechend mehr Zeit, um vor dem Einfrieren in die Zellen und nach dem Auftauen wieder aus den Zellen zu gelangen. Die Toleranzgrenze der Kryokonservierung scheint bei den Pferdeembryonen relativ abrupt mit einem Durchmesser von 200 bis 250 µm erreicht zu sein (Seidel 1996).

Eine auffallende Besonderheit der Pferdeembryonen ist die azelluläre Kapsel, deren Bildung etwa bei einer Größe des Embryos von 200-250 µm erfolgt (Betteridge 1989). Deren Dickenzunahme könnte die Diffusion des Kryoprotektivums erheblich behindern, sodaß dieses nur noch schwer in die Zellen hinein und heraus gelangen kann (Seidel 1996). PFAFF

und Mitarbeiter konnten zeigen, daß die Diffusion von Kryoprotektivum in die Zellen umso geringer ist, je mehr die Größe der Embryonen zunimmt. Die Embryonen wurden in drei Gruppen unterteilt: 150 bis 250 µm, 250 bis 500 µm und 500 bis 862 µm. Nach Zugabe des Kryoprotektivums erreichten die kleinsten Embryonen nach 20 Minuten wieder ihre ursprüngliche Größe. Die Größe der mittleren Embryonen nahm nach zehn Minuten nur sehr zögerlich wieder zu, während die Embryonen über 500 µm Durchmesser auch nach 20 Minuten noch an Volumen verloren. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß die Konzentration des Kryoprotektivums aufgrund mangelhafter Diffusion extrazellulär erheblich höher bleibt als intrazellulär (Pfaff et al. 1993). Eine Verbesserung der Verträglichkeit des Einfrierprozesses durch die Punktion der Kapsel konnte nicht erreicht werden, was allerdings auch daran liegen kann, daß die intakte Kapsel zur physiologischen Weiterentwicklung der Embryonen notwendig sein könnte (Pfaff 1994).

Neuere Untersuchungen deuten ebenfalls darauf hin, daß die Dicke (bis zu 0,8 µm) und die Permeabilität der Kapsel bei der Kryokonservierung eine wichtige Rolle spielen (Legrand et al. 2000). Dies ist damit zu erklären, daß es beim Vorhandensein einer dicken Kapsel zu keiner Flüssigkeitsbewegung durch Diffusion kommen kann und so die osmotischen Beschädigungen ausbleiben. Durch den mangelnden Austausch des Kryoprotektivums können diese Embryonen den Einfrierprozeß jedoch nicht tolerieren, während Embryonen ohne Kapsel diesen am besten überstehen. Durch Trypsin kann die Permeabilität der Kapsel verbessert werden. Hierzu werden die Embryonen vor der Kryokonservierung für 15 Minuten in ein 0,2 % Trypsinbad eingebracht. Nach nicht-chirurgischem Transfer von acht Embryonen (d 5,5-8,5) konnten sechs Trächtigkeiten etabliert werden (Legrand et al. 2000).

Eine weitere mögliche Erklärung für die Probleme der Kryokonservierung bei größeren Embryonen könnten unterschiedliche Anforderungen der inneren Zellmasse und des Trophoblasten an die Einfrierbedingungen sein. Direkte Untersuchungen dieser beiden Zelltypen wurden von mehreren Untersuchern durchgeführt, wobei alle aus ihren Beobachtungen folgern, daß die innere Zellmasse bei der Kryokonservierung stärker beschädigt wird als die Zellen des Trophoblasten (Wilson et al. 1987; Barry et al. 1989; Bruyas et al. 1993). Dies wurde auch dadurch bestätigt, daß nach dem Transfer von kryokonservierten Embryonen häufig nur der Trophoblast weiterwächst, was schließlich zum Abort führt (Seidel 1996).

### 7.2.2 Behältnisse zur Kryokonservierung

Die meisten Embryonen werden in Pailletten mit 0,25 oder 0,5 ml Volumen eingefroren. Auch andere Behältnisse können erfolgreich eingesetzt werden, die Einfrierverfahren müssen jedoch für jede Größe, Form und für jedes Material optimiert werden. Die wärmeleitenden Eigenschaften verschiedener Plastikarten und Glas sind unterschiedlich. Einen sehr wichtigen Punkt stellt auch das Verhältnis zwischen Oberfläche und Volumen dar. Pailletten haben im Vergleich zum Volumen eine große Oberfläche, wodurch eine flexible Regulation der Abkühl- und Erwärmungsraten ermöglicht wird. Allerdings können sich bei Behältnissen mit großer Oberfläche Temperaturschwankungen sehr schnell auswirken, so daß beim Umgang mit den gefrorenen Embryonen zügig gearbeitet werden muß. Hierzu ist es auch notwendig, die Pailletten mit einer klaren Beschriftung zu versehen, so daß diese gelesen werden kann, ohne daß sich die Pailletten erwärmen. Auch der Verschuß der Pailletten an beiden Enden ist äußerst wichtig, da sonst durch kleine Öffnungen flüssiger Stickstoff eindringen kann. Die Paillette kann dann beim Auftauen aufgrund des enormen Zuwachses an Volumen bei dem Übergang flüssigen Stickstoffs in den gasförmigen Zustand zerbersten (Seidel 1996).

In einigen Versuchen zur Kryokonservierung von Pferdeembryonen wurden Glasröhrchen- bzw. ampullen verwendet (Yamamoto et al. 1982; Boyle und Allen 1985; Czlonkowska et al. 1985). SLADE und Mitarbeiter verglichen den Effekt unterschiedlicher Einfrierverfahren. Sechs Tage alte Embryonen wurden entweder in 0,5 ml Plastikpailletten oder in 1 ml Glasampullen verpackt und entweder bei  $-33^{\circ}\text{C}$  oder bei  $-38^{\circ}\text{C}$  in flüssigen Stickstoff eingetaucht. Die Verwendung von Plastikpailletten und die Kühlung auf  $-33^{\circ}\text{C}$  vor dem Eintauchen in flüssigen Stickstoff hat sich dabei als die beste Methode erwiesen (Slade et al. 1984).

Bei der Vitrifikation kann auch ein „Open Pulled Straw“ (OPS) verwendet werden (Vajita et al. 1998; Oberstein et al. 2001). Dieses Verfahren ermöglicht sehr hohe Abkühl- und Auftauraten (über  $20.000^{\circ}\text{C} / \text{min}$ ) und der nur kurze Kontakt mit dem konzentrierten Kryoprotektivum (weniger als 30 Sekunden) eröffnet Möglichkeiten, Beschädigungen aufgrund der Einfriereffekte zu umgehen und die toxischen und osmotischen Beschädigungen zu minimieren. Eine andere Möglichkeit zur Vitrifikation bietet die „Cryoloop“-Technik (Lane et al. 1999; Lane et al. 1999). Dabei werden keine Pailletten verwendet, sondern der Embryo wird in einer kleinen Schlinge (zwischen 0,1 und 1,0 mm) plaziert, die am Deckel einer Kühllampulle befestigt ist. Sobald sich der Embryo in der Schlinge befindet, wird diese in die Kühllampulle mit flüssigem Stickstoff getaucht. OBERSTEIN und Mitarbeiter

verglichen diese beiden Vitrifikationstechniken mit der konventionellen Kryokonservierung (Oberstein et al. 2001). Es konnten keine Unterschiede bezüglich der Morphologie oder der Anzahl lebender Zellen festgestellt werden. Die Untersucher schließen daraus, daß die drei Methoden gleich gut geeignet sind, um kleine Pferdeembryonen einzufrieren.

### **7.2.3 Kryoprotektiva und Einfriermedien**

In den bisher publizierten Arbeiten zur Gefrierkonservierung wurden eine ganze Reihe von penetrierenden (Glyzerin, Ethylenglykol, DMSO, 1,2-Propandiol) und nicht penetrierenden Kryoprotektiva (Saccharose, Galaktose und Ficoll) überprüft. Die Zugabe des Kryoprotektivums erfolgte meist in zwei bis vier Schritten. Die jeweiligen Abkühlraten und die Verdünnung des Kryoprotektivums können Tabelle I im Anhang entnommen werden. Als Lagerungsmedium wurde in fast allen Fällen Dulbecco's phosphate buffered saline mit 10 % Serumzusatz verwendet. Nur in einem Fall wurde Hepes synthetic oviductal fluid (H-SOF) mit 8 mg / ml bovinem Serumalbumin (BSA) eingesetzt (Oberstein et al. 2001).

Bei einem Vergleich der Eignung von 1 M Glyzerin und 1,5 M DMSO wurde festgestellt, daß drei von elf sechs Tage alten Embryonen die Konservierung mit Glyzerin in flüssigem Stickstoff überlebten, während dies bei keinem der Embryonen bei der Verwendung von DMSO der Fall war. Dieses war in drei Schritten zugefügt worden (0,5 M für 10 min., 1,0 M für 10 min. und 1,5 M für 30 min.) (Yamamoto et al. 1982). Die Unfähigkeit von DMSO, Pferdeembryonen beim Einfrierprozeß effektiv zu schützen, wurde in einer weiteren Studie bestätigt (Bruyas et al. 1997). Dabei wurden 6,5 Tage alte Embryonen in drei Gruppen unterteilt: Gruppe 1 wurde in PBS Lösung mit 1,5 M DMSO bei 22°C eingebracht, Gruppe 2 wurde in dieser Lösung eingefroren und Gruppe 3 wurde als Kontrollgruppe nur in PBS eingebracht. Nach der Behandlung wurden die Embryonen für sechs Stunden in MEM mit BSA, Glutamin, Antibiotika und HEPES-Puffer inkubiert, fixiert und unter dem Mikroskop beurteilt. Embryonen der Gruppe 1 und 3 entwickelten sich zu normal erscheinenden Blastozysten, während die Embryonen der Gruppe 2 eine davon abweichende Struktur zeigten. Sie waren geprägt durch eine große, zentral liegende Masse aus Zellen des Trophoblasten und der inneren Zellmasse. Diese Befunde machen deutlich, daß DMSO (1,5 M) zwar nur eine geringe Toxizität auf frische Embryonen hat, aber nicht geeignet ist, sie beim Einfrieren zu schützen.



SEIDEL und Mitarbeiter zeigten, daß kleine Pferdeembryonen, die mit 1,2-Propandiol als Kryoprotektivum eingefroren wurden (PBS + 10 % 1,2-Propandiol, zugefügt in zwei Schritten), nach einer 48 stündigen Kultur *in vitro* morphologisch intakt erschienen (Seidel et al. 1989). In einer anderen Untersuchung konnte dagegen nach der Kryokonservierung von sechs Tage alten Embryonen mit 1,2-Propandiol (PBS + 11 % 1,2 Propandiol, zugefügt in zwei Schritten) aus 15 übertragenen Embryonen keine Trächtigkeit erzielt werden, während die Trächtigkeitsrate bei der Verwendung von Glycerin bei 40 % lag (Landim e Alvarenga et al. 1993; Meira et al. 1993). Dies deutet darauf hin, daß 1,2 Propandiol nicht in der Lage ist, Pferdeembryonen während der Kryokonservierung ausreichend zu schützen. Es ist allerdings nicht klar, ob dies durch den geringen kryoprotektiven Effekt von 1,2-Propandiol oder durch die ungenügende Permeabilität der Pferdeembryonen für dieses Kryoprotektivum bedingt ist. Die gute morphologische Beurteilung in der Untersuchung von SEIDEL und Mitarbeitern (Seidel et al. 1989) könnte darauf zurückzuführen sein, daß bei den meisten Embryonen die zytoplasmatischen Membranen intakt geblieben waren. Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung ließ sich jedoch feststellen, daß die meisten Zellorganellen der mit 1,2-Propandiol eingefrorenen Embryonen zerstört waren (Landim e Alvarenga et al. 1993).

Lange Zeit konnten nur mit Glycerin annehmbare Ergebnisse bei der konventionellen Kryokonservierung erreicht werden (Seidel 1996). Die Trächtigkeitsraten erreichten bis zu 50 % (Slade et al. 1984; Takeda et al. 1984; Skidmore et al. 1991). Für Embryonen über 200 µm wurde eine Kombination aus Glycerin und Saccharose getestet (Squires et al. 1989). Dabei wurde eine Gruppe mit 10 % Glycerin und 8,6 % Saccharose und die andere mit 15 % Glycerin und 15 % Saccharose bei unterschiedlicher Abkühlrate (siehe Anhang Tabelle I) eingefroren. Von 24 übertragenen Embryonen konnten nur zwei Trächtigkeiten etabliert werden, die Qualität der Embryonen nach dem Auftauen war bei beiden Gruppen gleich. YOUNG verwendete für die Kryokonservierung großer Blastozysten (> 250 µm) ebenfalls eine Kombination aus Glycerin und Zucker (2,0 M Glycerin + 0,3 M Galaktose) (Young et al. 1997). Damit konnten wesentlich bessere Ergebnisse erzielt werden als mit Glycerin alleine oder mit einer Mischung aus Ethylenglykol, Ficoll und Galaktose. Es wurde bei der Zugabe der Glycerin + Galaktose Kombination ein „step-down-Ausgleich“ des Kryoprotektivums durchgeführt, wobei die Embryonen zunächst in 2,0 M Glycerin, dann 4,0 M Glycerin für jeweils vier Minuten eingebracht werden. Der Ausgleich in 2,0 M Glycerin + 0,3 M Galaktose findet dann nochmals während fünf Minuten statt (siehe auch Tabelle I Anhang).

Die Permeabilität equiner Blastozysten ist für Ethylenglykol besser als für Glycerin (Pfaff et al. 1993). Beim Einsatz von Ethylenglykol als Kryoprotektivum konnte jedoch zunächst die Lebensfähigkeit der Embryonen bei der konventionellen Kryokonservierung nicht erhalten werden (Bruyas et al. 1994). HOCHI und Mitarbeiter konnten mit 10 % Ethylenglykol eine Trächtigkeitsrate von 25 % erreichen, bei der Kombination aus 10 % Ethylenglykol + 0,1 M Saccharose sogar 63,6 % (Hochi et al. 1996). In einem weiteren Versuch, bei dem 1,5 M Ethylenglykol verwendet wurden, konnten mit einer Trächtigkeitsrate von 30 % ähnliche Ergebnisse erzielt werden (Huhtinen et al. 2000). Bei der Vitrifikation wird Ethylenglykol in einer Konzentration von 40 % kombiniert mit 18 % Ficoll und 0,3 M Saccharose eingesetzt (Hochi et al. 1994; Hochi et al. 1995). Bis zu 87 % der Morulae und frühen Blastozysten entwickelten sich nach dem Auftauen *in vitro* weiter, aus fünf übertragenen Embryonen konnten zwei Trächtigkeiten etabliert werden; größere Embryonen (> 300 µm) wurden durch die Vitrifikation beschädigt. Auch in einem anderen Versuch sind sechs von acht dieser großen Embryonen nach der Vitrifikation degeneriert (Young et al. 1997). Auch die Kombinationen aus 25 % Glycerin + 25 % Ethylenglykol oder 8 M Ethylenglykol + 7 % Polyvinylpyrrolidon wurden erfolgreich zur Vitrifikation von Pferdeembryonen eingesetzt (Chaves et al. 1997).

#### **7.2.4 Auftauprozess**

Das Auftauen findet meist im Wasserbad bei 37°C für 10-20 Sekunden statt. SQUIRES und Mitarbeiter hielten die gefrorenen Embryonen vor dem Eintauchen in das Wasserbad zunächst für 20 Sekunden an der Luft, wodurch die Qualität der Embryonen größer als 200 µm gegenüber dem alleinigen Auftauen im Wasserbad deutlich verbessert werden konnte (Squires et al. 1989).

Die Methoden und Angaben zur Abkühlrate und zur Entfernung der Kryoprotektiva variieren zwischen den unterschiedlichen Untersuchern und können Tabelle I im Anhang entnommen werden.

### **7.3 Morphologische Veränderungen nach der Kryokonservierung**

Aufgrund zweier Untersuchungen zur Struktur (Wilson et al. 1987) und zur metabolischen Aktivität (Rieger et al. 1991) von Embryonen wurde vermutet, daß die Behandlung mit dem Kryoprotektivum Glycerin, nicht aber der Einfrierprozeß die meisten Beschädigungen an den Embryonen induziert. Diese Vermutung konnte auch durch weitere Untersuchungen bestätigt werden (Bruyas et al. 1993). So ist die Anzahl pyknotischer Kerne nach der Kultur von nur mit Glycerin behandelten und mit Glycerin eingefrorenen Embryonen nahezu gleich, ebenso die Anzahl an Embryonen mit ausgestoßenen Blastomeren, Blastozoelekollaps und gewellter Kapsel. Die innere Zellmasse war bei einigen Embryonen stärker beschädigt als die Zellen des Trophoblasten. Auch diese Beobachtung bestätigt die Vermutungen vorangegangener Untersuchungen (Wilson et al. 1987; Barry et al. 1989), daß die innere Zellmasse sensibler auf Behandlungen wie Kryokonservierung (Glycerin) und Kultur reagiert als der Trophoblast.

### **7.4 Schlußfolgerung**

Die Möglichkeit der Kryokonservierung von Pferdeembryonen vereinfacht den Transferablauf, da hierbei die Zyklussteuerung zwischen Spender- und Empfängerstute unabhängig voneinander durchgeführt werden kann. Die Kryokonservierung von Pferdeembryonen kann entweder mit der konventionellen Methode oder mit der Vitrifikation durchgeführt werden. Als Behältnisse werden meist 0,25 oder 0,5 ml Pailletten verwendet, zur Vitrifikation kann auch das „Open Pulled Straw“ oder der „Cryoloop“ verwendet werden. Als Kryoprotektiva werden vor allem Glycerin und Ethylenglykol verwendet, während bei der Vitrifikation meist Mischungen verschiedener penetrierender und nicht-penetrierender Kryoprotektiva verwendet werden. Kleinere Embryonen ( $< 250 \mu\text{m}$ ) überleben die Kryokonservierung deutlich besser als große, was vor allem mit dem Vorhandensein und der Dicke der equinen Kapsel in Verbindung gebracht wird. Die Trächtigkeitsraten von Embryonen aus konventioneller Kryokonservierung lagen zwischen 10 und 63 %, bei der Vitrifikation bei 40 %.

## **8. Mikrochirurgische Eingriffe an Embryonen und Kerntransfer**

Es gibt verschiedene Indikationen, mikrochirurgische Eingriffe an Embryonen durchzuführen. Zum einen können durch die mikrochirurgische Teilung von Embryonen monozygote Zwillinge erzeugt werden. Das Vorkommen monozygoter Zwillinge bei Pferden ist extrem selten; treten Zwillinge auf, sind diese in fast allen Fällen dizygot. Das erste belegte Vorkommen monozygoter Drillinge wurde 1995 von MEADOWS und Mitarbeitern beschrieben (Meadows et al. 1995). Monozygote Zwillinge könnten jedoch in Studien, in denen z.B. genetisch beeinflusste Erkrankungen wie Osteochondrosis dissecans oder das Wobbler Syndrom untersucht werden, eingesetzt werden. Diese Studien sind sehr teuer, da eine große Anzahl an Pferden für die Untersuchungen notwendig sind. Durch den Einsatz monozygoter Zwillinge kann der genetische Einfluß eliminiert werden. Ein Zwilling wird einer Behandlung unterworfen, der andere dient als Kontrolle; dadurch würden weniger Tiere benötigt werden. Auch im Hinblick auf die Funktion der bei Pferdeembryonen vorhandenen azellulären Kapsel sind die Ergebnisse der Mikrochirurgie interessant (McKinnon et al. 1989). Eine weitere Indikation für die mikrochirurgische Manipulation ist das Sexing von Embryonen. Durch die Geschlechtsbestimmung der Embryonen können gezielt und nach Wunsch des Züchters Hengst- oder Stutfohlen erzeugt werden (Peippo et al. 1995). Bei verschiedenen Spezies konnte der Kerntransfer (Klonen) bereits erfolgreich durchgeführt werden. In den letzten Jahren wurden auch beim Pferd einige Untersuchungen durchgeführt, geklonte Nachkommen von Pferden konnten bisher jedoch noch nicht produziert werden (Squires et al. 2003).

### **8.1 Produktion monozygoter Zwillinge durch Mikromanipulation**

Den ersten Erfolg bei der künstlichen Erzeugung monozygoter Zwillinge beim Pferd konnten 1980 WILLADSEN und Mitarbeiter verzeichnen (Willadsen et al. 1980). Nach derselben Methode gingen auch ALLEN und PASHEN vor (Allen und Pashen 1984). Embryonen im 2- bis 8-Zell-Stadium wurden ein bis drei Tage post ovulationem chirurgisch gewonnen. Nach Entfernung der Zona pellucida wurden die Blastomeren mechanisch mit einem Mikromanipulator in zwei oder vier Anteile mit identischer Zellzahl geteilt. Diese Anteile wurden dann jeweils in eine evakuierte Zona pellucida von Schweineoozyten eingebracht. Die

weitere Behandlung der mikromanipulierten Embryonen bestand in der Einbettung in zwei Zylinder aus Agar nach der Methode von WILLADSEN. Dabei besteht der erste Zylinder aus 1 % Agar in 0,9 % NaCl, der zweite, in welchen der erste Zylinder eingebettet wird, aus 1,2 % Agar in 0,9 % NaCl. Die Zylinder mit den Embryonen wurden dann laparoskopisch in ligierte Eileiter von anöstrischen Schafen zur Weiterentwicklung bis zum Stadium der späten Morula bzw. frühen Blastozyste eingebracht. Nach 3,5 bis 5 Tagen wurden die Agarzylinder wieder entfernt und die Embryonen daraus befreit. Embryonen, die das angestrebte Entwicklungsstadium erreicht hatten, wurden chirurgisch oder transzervikal auf synchrone Empfängerstuten übertragen. Die daraus entstandenen Blastozysten hatten grundsätzlich dasselbe Erscheinungsbild wie nicht manipulierte Blastozysten. Allerdings enthielten die Blastozysten aus geteilten Embryonen weniger Zellen und waren dementsprechend deutlich kleiner. Die Ergebnisse des Versuches sind in Tabelle 9 zusammengefaßt.

Durch diesen Versuch wurden zwei monozygote Zwillingspärchen (zwei Hengst- und zwei Stutfohlen) gewonnen. Die Zwillingspärchen zeigten z.T. deutliche Unterschiede in Trächtigkeitsdauer und Geburtsgewicht, was wahrscheinlich eher auf Einflüsse wie Größe der Mutter (Walton und Hammond 1938) und fetaler Genotyp zurückzuführen ist, als auf einen direkten Effekt der Mikromanipulation (Allen und Pashen 1984). Eine weitere Auffälligkeit beider Zwillingspaare war der deutliche Unterschied in der Art der Abzeichen an den Beinen und am Kopf. Dieses Phänomen scheint auf geringe, zufällig geschehende Unterschiede in der Genexpression der Haarfollikelzellen zurückzugehen, welche für die weißen Abzeichen verantwortlich sind.

**Tabelle 9:** Ergebnisse des Versuches von ALLEN und PASHEN (Allen und Pashen 1984)

	halbierte Embryonen	geviertelte Embryonen
Anzahl der Stuten, die zur Embryonengewinnung herangezogen wurden	16	7
Anzahl der Blastomeren in den gewonnenen Embryonen	2-8	3-4
Anzahl der durch Mikromanipulation erzeugten Teil-Embryonen	27	17
Anzahl der Embryonen, die sich zu normalen späten Morulae oder frühen Blastozysten entwickelten	14	12
Anzahl der transferierten Embryonen (Anzahl trächtig)		
nicht chirurgisch	1 (0)	5 (0)
chirurgisch	13 (5)	11 (5)

Da bei dieser Versuchsanordnung ein Eingriff zur Gewinnung von Embryonalstadien aus dem Eileiter notwendig ist, wurden auch Versuche mit älteren, nicht-chirurgisch gewonnenen Embryonen durchgeführt. Die transzervikale Gewinnung von Embryonen ist erst ab Tag 5,5 bis 6 post ovulationem möglich, da sich die Embryonen vorher noch nicht im Uterus befinden (Oguri und Tsutsumi 1972; Betteridge et al. 1982; Freeman et al. 1991). Ab Tag 6 p.o. beginnt die Bildung der azellulären Kapsel (Flood et al. 1982). Bei Versuchen mit sieben Tage alten Pferdeembryonen, welche schon eine elastische Kapsel besitzen, hat sich gezeigt, daß das Eindringen einer mikrochirurgischen Klinge durch die Kapsel schwierig ist (Slade et al. 1984). In einem Folgeversuch wurden Embryonen, die am Tag 5,5 oder 6 p.o. gewonnen wurden und kleiner als 175 µm waren, verwendet (Slade et al. 1984). Dabei wurde nicht nur der Transfererfolg, sondern auch zwei unterschiedliche Medien zur Kultur der geteilten Embryonen untersucht. Die Teilung erfolgte mechanisch durch einen Leitz-Mikromanipulator. Diese Methode wurde bereits von WILLIAMS und Mitarbeitern für Rinderembryonen beschrieben (Williams et al. 1983). Eine Hälfte der Embryonen wurde in der originalen Zona pellucida belassen, die andere in eine evakuierte Zona pellucida eines Rindes überführt. Die geteilten Embryonen wurden dann für jeweils 24 Stunden bei 37°C kultiviert, wobei jeweils eine Hälfte in Ham's F 10 mit 10 % FCS in einem Luftgemisch mit 5 % CO<sub>2</sub> aufbewahrt wurde, die andere Hälfte in PBS mit 10 % FCS. Die Embryonen wurden chirurgisch übertragen. Sowohl die Qualität als auch die Weiterentwicklung bis zur Bildung der Blastocoele war besser für Embryonen in Ham's F 10. Aus zwei geteilten Embryopaaren entwickelte sich ein Zwillingsspaar bis zum 150. Tag der Trächtigkeit (Zeitpunkt der Veröffentlichung). Demnach können auch aus nicht-chirurgisch gewonnenen Embryonen monozygote Zwillinge produziert werden. Allerdings war die Embryogewinnungsrate am Tag 5,5 p.o. mit 9 % relativ niedrig. Die meisten der am Tag 6 p.o. gewonnenen Embryonen besitzen bereits eine Kapsel, was die Teilung erschwert.

In weiteren Versuchen wurden zwei Methoden der Embryonenteilung verglichen: zum einen die mechanische Teilung mit einem Mikromanipulator und zum anderen die Teilung der in einer Petrischale fixierten Embryonen von Hand, mit einer durch einen mikrochirurgischen Arm geführten Klinge (McKinnon et al. 1989). Hierfür wurden am Tag 6 p.o. Morulae oder frühe Blastozysten gewonnenen. Anschließend wurden die Embryonen für fünf Tage bei 37,5°C in Ham's F 10 mit 10 % FCS bei 5 %igem CO<sub>2</sub> Anteil kultiviert. Alle Embryonen entwickelten sich physiologisch weiter. Dabei gab es zwischen den Methoden keinen Unterschied im anschließenden Wachstum, Entwicklungsstadium und in der Qualität der Embryonen. Die Teilung von Hand war aber einfacher und weniger zeitaufwendig als die

Teilung mit dem Mikromanipulator. In einem weiteren Experiment wurden jeweils zwei ganze oder zwei halbe Embryonen chirurgisch in das Uterushorn von Empfängerstuten transferiert. Die Trächtigkeitsrate bei den ungeteilten Embryonen lag mit 72,7 % höher als bei den geteilten Embryonen mit 22,7 %. Ähnliche Trächtigkeitsraten geben auch MÜLLER und CIKRYT an, die für ungeteilte Embryonen 69 % und für geteilte Embryonen 33 % betrugen (Müller und Cikryt 1989). Allerdings erwähnen diese Autoren, daß ausschließlich geteilte Morulae zu einer Trächtigkeit führten, während der Transfer geteilter Blastozysten nicht zum Erfolg führte. Diese Beobachtung wurde auch von SKIDMORE und Mitarbeitern gemacht (Skidmore et al. 1989). Die Rate an Zwillingsträchtigkeiten war bei den ungeteilten Embryonen höher (McKinnon et al. 1989). Dies weist darauf hin, daß die Lebensfähigkeit geteilter Embryonen geringer ist als die ungeteilter Embryonen. In einem dritten Versuch wurde schließlich der nicht-chirurgische Transfer geteilter Embryonen mit bzw. ohne Agarkapsel verglichen. Dabei war die Trächtigkeitsrate für geteilte Embryonen ohne Agarkapsel mit 53,3 % höher als für jene mit Agarkapsel (44 %). In dieser Studie wurde erstmals von der erfolgreichen Etablierung von Trächtigkeiten bei Stuten mit Embryonen ohne Zona pellucida oder Kapsel berichtet.

Bezüglich der Kapsel der Pferdeembryonen ließ sich beobachten, daß mikrochirurgisch geteilte Embryonen nach dem Transfer im Uterus erneut eine Kapsel bilden, während sie das bei der *in vitro*-Kultur nicht tun (McKinnon et al. 1989; Skidmore et al. 1989). Bei Embryonen, die vor der Kultur schon eine Kapsel gebildet hatten, wurde diese kontinuierlich dünner, bis sie schließlich abgeworfen wurde oder einfach degenerierte. War die Kapsel vor der Kultur noch nicht vorhanden (Morulae), entwickelte sie sich bei keinem der Embryonen. Diese Embryonen durchbrachen die begrenzende Zona pellucida früher und schienen aus dieser in der Art boviner Embryonen zu schlüpfen (Elsden und Seidel 1985). Diese Beobachtung würde auch erklären, warum dieser Prozeß des Schlüpfens physiologischerweise bei equinen Embryonen nicht vorkommt. Zudem scheint die Interaktion zwischen Embryo und Uterus für die Bildung der Kapsel essentiell zu sein (McKinnon et al. 1989).

## 8.2 Sexing von Embryonen

Durch die Feststellung des Geschlechts von Embryonen kann vor dem Transfer eine Geschlechtsselektion vorgenommen werden. Zunächst verwendete man zytogenetische und

immunologische Verfahren, wie die Identifikation des Y-Chromosoms in der Metaphase (Murer-Orlando et al. 1982; Romagnano et al. 1985; Romagnano et al. 1987) oder die Darstellung des HY-Antigens auf der Zelloberfläche (Wood et al. 1988). Die zytogenetische Methode ist sehr genau, vorausgesetzt, daß genügend verwertbare Metaphasen zur Verfügung stehen. Werden ganze Embryonen untersucht, stehen bei 77 bis 100 % der untersuchten Embryonen auswertbare Karyogramme zur Verfügung. Die Nachteile dieser Methode sind eventuell zu wenige verwertbare Metaphasen, relativ lange Kulturperioden und die Invasivität dieses Eingriffs. Mit der immunologischen Methode konnte eine Genauigkeit von 82 % erreicht werden (Wood et al. 1988). Obwohl diese Methode weniger invasiv und zeitaufwendig ist als die Erstellung des Karyotyps, ist die Beurteilung der Ergebnisse starken subjektiven Einflüssen unterworfen.

Heute werden vor allem molekularbiologische Methoden eingesetzt. Auf dem männlichen Y-Chromosom sind DNA-Sequenzen lokalisiert, die im Genom des weiblichen Tieres fehlen. Durch die selektive Markierung dieser Y-spezifischen DNA-Sequenzen können daher männliche von weiblichen Embryonen unterschieden werden. Es gibt zwei verschiedene Verfahren, diese Sequenzen zu identifizieren: DNA- Sonden und die Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction = PCR). DNA-Sonden sind radioaktiv markierte DNA-Fragmente, die komplementär zu einer spezifischen DNA-Sequenz auf dem Y-Chromosom aufgebaut sind. Sie gehen mit diesem Fragment eine Bindung (Hybridisierung) ein, die nach einer etwa sechstägigen Inkubationszeit durch die radioaktive Markierung der Sonde durch Autoradiographie sichtbar wird. Für Pferde stehen DNA-Sonden bisher jedoch nicht zur Verfügung (Kräusslich 1994).

Das Ergebnis der PCR liegt bereits nach sechs Stunden vor. Benötigt werden ein bis zwei Blastomeren, die dem Embryo nach Durchstechen der Zona pellucida mit einer durch einen Mikromanipulator gelenkten Mikropipette entnommen werden. Mit Hilfe zweier kleiner synthetischer DNA-Fragmente („primer“) wird das Enzym Polymerase an die Y-spezifische Sequenz der durch entsprechende Behandlung freigesetzten DNA gebunden. Diese bewirkt in zeitlich definierten Zyklen aus Erhitzung und Abkühlung eine millionenfache Vervielfältigung dieser Sequenz. Nach elektrophoretischer Auftrennung ist die Y-spezifische Sequenz aufgrund der hohen Kopienzahl als deutliche Bande sichtbar. Mit dieser Methode konnte beim Pferd eine Treffsicherheit von 96,3 % erreicht werden (Peippo et al. 1995). Da bei dieser Methode nur sehr wenige Blastomeren benötigt werden, wird der Embryo durch die Entnahme in seiner Vitalität nicht beeinträchtigt. Aufgrund des geringen Zeitaufwandes von



nur sechs Stunden lässt sich die PCR gut in den Zeitplan eines Embryotransferprogrammes integrieren (Kräusslich 1994).

### **8.3      Kerntransfer (Klonen)**

Der Transfer von Kernen somatischer Zellen in Empfängeroozyten wurde bei verschiedenen Spezies erfolgreich durchgeführt. Dabei werden sich in der Metaphase II befindende Empfängeroozyten enukleiert und mit somatischen Zellen fusioniert. Auch die direkte Injektion des Zellkerns in das Zytoplasma der Oozyte ist möglich. Beim Pferd ist bisher noch kein Bericht über die erfolgreiche Produktion geklonter Nachkommen bekannt (Squires et al. 2003). Die Fusionsrate von Pferdeoözyten mit adulten somatischen Donorzellen wird bei Elektrofusion mit 20 bis 67 % (Reggio et al. 2000; Choi et al. 2001) angegeben. Bei einer Kombination der Elektrofusion mit dem Einsatz des Sendai-Virus (Paramyxovirus: besitzt als behülltes Virus die Fähigkeit, mit Zellmembranen zu fusionieren) wurden bessere Fusionsraten von bis zu 82 % (Li et al. 2002) erreicht. Die direkte Injektion des Zellkerns in die Oozyte ergab nach der Aktivierung der Oozyten eine Reprogrammierung (Veränderungen in der Größe des Donorkerns und des Chromatinformats) von 14 bis 30 % (Li et al. 2000). In diesen Studien wurden die Oozyten nach der Rekonstruktion durch die Verwendung von Kalziumionophor und die anschließende Inkubation mit Cycloheximid oder 6-DMAP (6-Dimethylaminopurin) oder durch die Behandlung mit Kalziumionophor mit Ethanol aktiviert.

CHOI und Mitarbeiter (Choi et al. 2002; Choi et al. 2002) verwendeten zum Kerntransfer (als Donorzellen wurden Fibroblasten verwendet) eine mit piezoelektrischen Impulsen betriebene Pipette. Zur Aktivierung der rekonstruierten Oozyten wurde von Hengstsperrmien gewonnenes Zytosolextrakt verwendet, welches den Oozyten intrazytoplasmatisch injiziert wurde. Das Zytosolextrakt wurde mit vier verschiedenen Proteinkonzentrationen (59/ 176/ 293 und 1375 µg/ml) und mit zwei verschiedenen Aktivierungszeitpunkten (1,5-2 h oder 8-10 h nach dem Kerntransfer) getestet. Die Rekonstruktionsrate betrug bei Verwendung der Piezo-Pipette 82 %. Die Teilungsrate und die Aktivierung (Formation eines Pseudopronukleus und Teilung) war bei der Verwendung des Zytosolextraktes mit 59 µg/ml Protein deutlich niedriger als bei den anderen Dosierungen. Es konnten Aktivierungsraten von bis zu 72 % und Teilungsraten von bis zu 51 % erreicht werden. Die hier durch die Injektion von Spermienzytosol erreichten Werte liegen höher als in anderen Untersuchungen bei der Verwendung von Kalziumionophor und Cycloheximid

(29 % Aktivierungsrate und 9 % Teilungsrate) (Choi et al. 2001). Allerdings war der Anteil rekonstruierter Embryonen mit normalen Nuklei nach vier Tagen *in vitro*-Kultur gering (6-22 %). Die maximal festgestellte Anzahl an Kernen bei den Embryonen betrug zehn (Choi et al. 2002; Choi et al. 2002). Neben dem Kerntransfer in Pferdeoozyten wurden auch bovine Oozyten als Empfänger für die Nuklei der equinen Fibroblasten getestet. Hierbei konnte eine Rekonstruktionsrate von 81 % und eine Teilungsrate von 88 % erreicht werden. Die Teilungsrate mit normalen Nuklei betrug 73% (Choi et al. 2002).

Auch SANSINENA und Mitarbeiter verwendeten bovine Oozyten als Empfänger für equine Fibroblasten zweier Stuten (Sansinena et al. 2002). In diesem Versuch wurde die Elektrofusion verwendet; zur Aktivierung wurden die fusionierten Oozyten mit Ionomycin und Cycloheximid behandelt. Die Fusionsraten bei der Verwendung von equinen und bovinen Fibroblasten als Donorzellen waren vergleichbar (57 % gegenüber 51 %). Die Teilungsrate betrug bei der Verwendung von Fibroblasten von Stute A 70 %, von Stute B 50 % und für bovine Fibroblasten 51 %. Dabei entwickelten sich Embryonen aus equinen Fibroblasten bis zum 8- bis 16-Zell-Stadium weiter. Jeweils vier Embryonen der Fibroblasten von Stute A und B wurden nach zwei Tagen Kultur *in vitro* chirurgisch in die Eileiter synchronisierter Empfängerstuten übertragen. Es konnte jedoch keine Trächtigkeit etabliert werden.

Der Einfluß des Alters der Donorzelle auf die Reprogrammierung und die Erreichung des Zwei-Zell-Stadiums wurde von LI und ALLEN untersucht (Li und Allen 2002). Als Donorzellen wurden fetale Fibroblasten oder adulte Haut-Fibroblasten verwendet, welche *in vitro* für unterschiedlich viele Kulturzyklen (3 bis 15 Zyklen, jeweils 7 bis 9 Tage) kultiviert wurden. Die Fusionsraten bei Verwendung einer Kombination aus inaktiviertem Sendai-Virus und Elektrofusion sind mit 79 % für fetale und 70 % für adulte Fibroblasten vergleichbar. Nach einer 28 bis 30 stündigen Kultur *in vitro* zeigte sich, daß der Anteil an Embryonen im Zwei-Zell-Stadium sowohl nach dem Kerntransfer fetaler als auch adulter Fibroblasten mit zunehmendem Zellalter abnahm. Dies deutet darauf hin, daß der in das Zytoplasma einer Empfängeroozyte übertragene Nukleus alternder Zellen ein geringeres Potential zur Reprogrammierung besitzt.

Ein erster Bericht von etablierten Trächtigkeiten nach Kerntransfer wurde von WOODS und Mitarbeitern (Woods et al. 2002) veröffentlicht. Dabei wurden Fibroblastzellen eines Maultierfetus mit enukleierten Stutenoozyten durch Elektrofusion verschmolzen und anschließend durch die Behandlung mit Ionomycin und Cycloheximid aktiviert. Direkt im Anschluß übertrug man die geklonten Embryonen chirurgisch in die Eileiter synchroner Empfängerstuten (ein bis neun Embryonen / Stute), welche 24 h vor dem Transfer ovuliert

hatten. Sieben der 195 geklonten Embryonen resultierten in einer Trächtigkeit (3,6 %). Alle Trächtigkeiten wurden jedoch zwischen Tag 27 und 61 der Gestation spontan verloren. Obwohl alle sieben Trächtigkeiten länger als 25 Tage erhalten blieben, entwickelte sich nur ein Embryo physiologisch. Bei diesem ließ sich der Herzschlag mit Ultraschall darstellen. Es wird deshalb vermutet, daß die anderen Fruchtanlagen nur die Entwicklung trophoblastischer Bläschen repräsentierten (Woods et al. 2002). Es wurde berichtet, daß sich in ungefähr 4 % der equinen Trächtigkeiten trophoblastische Vesikel entwickeln (Vanderwall et al. 2000). Der hohe Anteil von fehlerhaften Embryonalentwicklungen deutet darauf hin, daß bedeutende Fehler während der Reprogrammierung der geklonten Maultierzellen auftraten, welche die Formation und / oder die Entwicklung der inneren Zellmasse beeinträchtigten.

#### **8.4      Schlußfolgerungen**

Mikrochirurgische Eingriffe an Pferdeembryonen können zur Produktion monozygoter Zwillinge und zum Sexing der Embryonen eingesetzt werden. Die Teilung der Embryonen zur Produktion monozygoter Zwillinge kann sowohl mechanisch mit einem Mikromanipulator erfolgen, als auch durch eine manuell geführte Klinge. Embryonen im Stadium der Morula bis frühen Blastozyste vor Ausbildung der azellulären Kapsel können verwendet werden. Dies bedeutet, daß die Embryonen entweder chirurgisch gewonnen werden müssen oder am Tag 5,5 post ovulationem aus dem Uterus, wobei nur niedrige Gewinnungsraten von ca. 10 % zu erwarten sind. Die Kultivierung vor dem Transfer erfolgt in Ham's F 10 mit Serumzusatz in einem Luftgemisch mit 5 % CO<sub>2</sub>. Die Trächtigkeitsraten für geteilte Embryonen liegen zwischen 22 und 53 %. Mikrochirurgisch geteilte Embryonen bilden bei der *in vitro*-Kultur keine Kapsel, wohl aber nach dem Transfer in den Uterus. Die Interaktion zwischen Embryo und Uterus scheint für die Bildung der Kapsel essentiell zu sein. Durch das Sexing von Embryonen kann vor dem Transfer eine Geschlechtsselektion vorgenommen werden. Die PCR ist hierfür die Methode der Wahl. Da das Ergebnis schon nach ungefähr sechs Stunden vorliegt und nur ein bis zwei Blastomeren zur Untersuchung entnommen werden müssen, läßt sich diese Untersuchung gut in den Ablauf eines Embryotransferprogrammes integrieren. Durch den Kerntransfer konnten bisher beim Pferd noch keine lebenden Nachkommen produziert werden.

## 9. Oozytengewinnung

Fruchtbarkeitsstörungen haben eine wesentliche Auswirkung auf die Wirtschaftlichkeit in der Pferdezucht. Der Embryotransfer kann nur in einigen wenigen Fällen (Störung in der Implantation, etc.) dazu beitragen, Fohlen von ansonsten unfruchtbaren Stuten zu erzeugen. Die Oozytengewinnung mit anschließender Befruchtung *in vitro* oder die Übertragung der Eizelle auf die Empfängerstute mit Befruchtung *in vivo* könnte eine Möglichkeit bieten, von Stuten mit einer ganzen Reihe von nicht therapierbaren Störungen Fohlen zu erhalten (Squires und Cook 1996; Hinrichs 1997). Eine weitere Indikation ist die Gewinnung von Oozyten zur Erforschung der Oozytenreifung und Befruchtung *in vitro* (Hinrichs 1991).

### 9.1 Chirurgische Oozytengewinnung

Dieser Eingriff wird am stehenden Pferd von der Flanke aus durchgeführt. Die Stuten erhalten zur Sedation Acepromazin (10 – 30 mg i.v.) und zur Analgesie Butorphanol (10 – 15 mg i.v.), zudem antibiotische Versorgung (6 g Ampicillin i.v.). (Hinrichs 1997). Nach Sedation und Lokalanästhesie im Bereich der Hungergrube wird nach Durchtrennung der Haut und Bauchmuskeln die Bauchhöhle eröffnet, und das Ovar mit dem präovulatorischen Follikel vorgelagert. Von den Untersuchern wurden zwei Aspirationsmethoden getestet: zum einen die Aspiration mit einer Spritze mit anschließender Spülung des Follikels mit physiologischer Kochsalzlösung, zum anderen die Aspiration mit einer Vakuum-Pumpe bei gleichzeitiger Spülung über eine zweite Nadel (Vogelsang et al. 1986; Vogelsang et al. 1988). Die Oozytengewinnungsrate lag bei der ersten Methode bei 14 %, bei der zweiten mit 60 % deutlich höher. Durch exogene Hormongabe bei Feststellung eines dominanten Follikels konnte die Oozytengewinnungsrate mit der zweiten Methode auf 83 % gesteigert werden. Die zur Stimulation der Follikelreifung verwendeten Hormonpräparate waren Gonadorelin = Cystorelin ( Abbott Lab., N. Chicago, IL 60064), Buserelin = Receptal® ( Hoechst Corp., Somerville, NJ 08876) und Choriongonadotropin ( Metro Med., Inc., Austin, TX 78766). Die chirurgische Methode zur Oozytengewinnung wird aufgrund ihrer Invasivität, den entstehenden Vernarbungen und Adhäsionen an der Schnittstelle und der damit verbundenen Problematik bei wiederholter Durchführung heute jedoch kaum mehr angewendet.

## 9.2 Follikelpunktion von der Flanke aus

Die Follikelpunktion von der Flanke aus wird ebenfalls am stehenden, sedierten Pferd durchgeführt. Zunächst wird die Punktionstelle rasiert, gewaschen und desinfiziert. Ein Lokalanästhetikum wird verabreicht. Eventuell wird bei rektaler Manipulation des Ovars zusätzlich eine Epiduralanästhesie durchgeführt (Palmer et al. 1987). Die Manipulation des Ovars kann entweder vom Rektum aus erfolgen (Palmer et al. 1986; Vogelsang et al. 1986; Palmer et al. 1987; Vogelsang et al. 1988; Hinrichs et al. 1990) oder nach Kolpotomie direkt von der Bauchhöhle aus (Hinrichs und Kenney 1987; Hinrichs et al. 1990). Bevor die Haut, die Muskeln und das Peritoneum durchstoßen werden, wird das Ovar in Richtung Bauchhöhle zurückgezogen, um eine ungewollte Punktion zu verhindern. Nach der Punktion der Bauchhöhle muß das Ovar palpatorisch in eine zur Punktion günstige Position gedreht werden (Vogelsang et al. 1988).

Die zur Punktion verwendeten Nadeln haben eine Länge von 15 cm (Vogelsang et al. 1988) und eine Stärke von 13 G (Vogelsang et al. 1988), 14 G (Hinrichs und Kenney 1987; Hinrichs et al. 1990) oder 16 G (Vogelsang et al. 1988). Sie werden entweder einlumig mit einer Spritze zur Aspiration und / oder Spülung verwendet (Hinrichs und Kenney 1987) oder doppellumig zur gleichzeitigen Spülung und Aspiration (Vogelsang et al. 1986). Zur kontinuierlichen Spülung kann alternativ auch eine zweite Nadel eingeführt werden (Vogelsang et al. 1986; Vogelsang et al. 1988). Auch die Verwendung einer Nadel mit Drei-Wege-Hahn wird beschrieben (Palmer et al. 1987). Die Kanüle wird zur Punktion mit leichtem Unterdruck in der Spritze gehalten, um keine Follikelflüssigkeit zu verlieren. Nach der Punktion wird der Follikelinhalt möglichst vollständig aspiriert. Das Auftreten von Blut im Aspirat kann als Anzeichen einer kompletten Entleerung des Follikels gewertet werden, ebenso die Palpation einer Vertiefung an der ehemaligen Lokalisation des Follikels auf dem Ovar (Vogelsang et al. 1988). Zum Absaugen der Follikel- und Spülflüssigkeit kann an Stelle einer Spritze auch eine Vakuumpumpe mit einem Unterdruck von 100 mmHg (Hinrichs et al. 1990) oder 175-200 mmHg (Vogelsang et al. 1988) verwendet werden. Diese kann auch mit einer kontinuierlichen Spülvorrichtung gepaart werden. Das Vakuumsystem wird simultan mit dem Einstich gestartet. Vor Beendigung des Spülvorgangs muß der Zulauf von Spülflüssigkeit unterbrochen werden, um den Follikel dann vollständig zu entleeren (Vogelsang et al. 1988). VOGELSANG und Mitarbeiter konnten mit dem Vakuumsystem bessere Oozytengewinnungsraten erreichen (38 % gegenüber 10 % mit der Spritze) (Vogelsang et al. 1988), während HINRICHS und Mitarbeiter beim Vergleich der beiden

Methoden Spritze bzw. Vakuumpumpe keine signifikanten Unterschiede im Bezug auf die Oozytengewinnungsrate feststellen konnten (Hinrichs et al. 1990).

Als Spülflüssigkeit kann sterile physiologische Kochsalzlösung (Vogelsang et al. 1986; Vogelsang et al. 1988), physiologische Kochsalzlösung mit Heparin (Vogelsang et al. 1988), modifizierte PBS-Lösung (Hinrichs und Kenney 1987), PBS mit 60.000 IU Penicillin, 60.000 mg Streptomycin und 20 IU Heparin pro Liter (Hinrichs et al. 1990) oder PBS mit 100 IU/ 100 ml Heparin (Palmer et al. 1987) dienen. Die Häufigkeit des Spülens und das Volumen der Spülflüssigkeit werden unterschiedlich gehandhabt. Bei einer kontinuierlichen Spülung wird das Volumen der Spülflüssigkeit mit 100-150 ml (Vogelsang et al. 1988) angegeben. Wird diskontinuierlich gespült, beträgt das Spülvolumen 20 ml (Palmer et al. 1987) bis 30 ml / Spülung (Hinrichs und Kenney 1987; Hinrichs et al. 1990). Hierbei hat sich bei der Kolpotomie-Methode gezeigt, daß sich bei dreimaliger Spülung des Follikels alle Oozyten in der ursprünglichen Follikelflüssigkeit oder in der ersten Spülflüssigkeit befanden, jedoch keine in der zweiten oder dritten. Da sich jedoch bis zu 50 % der Oozyten in der ersten Spülflüssigkeit befinden, scheint eine Spülung des Follikels notwendig zu sein. Bei der Manipulation des Ovars vom Rektum aus kann es aufgrund der Peristaltik schwierig sein, die Nadel für die Dauer einer Spülung im Follikel zu halten (Hinrichs und Kenney 1987; Hinrichs et al. 1990). Auch konnten bei rektaler Manipulation des Ovars und Aspiration mit einer Spritze alle gewonnenen Oozyten mit der Follikelflüssigkeit aspiriert werden, in der Spülflüssigkeit befanden sich keine Oozyten (Vogelsang et al. 1988).

Die Aspiration der präovulatorischen Follikel findet bei einer Größe von 33 bis 45 mm statt (Palmer et al. 1986) bzw. einen Tag, nachdem der Follikel einen Durchmesser von 35 mm erreicht hat (Hinrichs und Kenney 1987). Andere Untersucher nennen den Zeitpunkt, an dem der Follikel die charakteristischen Anzeichen der bevorstehenden Ovulation zeigt (Vogelsang et al. 1988). Die Aspiration immaturer präovulatorischer Follikel ist ab einer Größe von  $32 \pm 2$  mm beschrieben. Die Gewinnung von präovulatorischen Stutenoozyten verschiedener Reifestadien stellt eine Möglichkeit dar, die Entwicklung der Oozyten bis zur Ovulation zu beobachten. Dadurch können wichtige Informationen bezüglich der *in vitro*-Reifung von Pferdeoozyten gewonnen werden (Hinrichs et al. 1990). Die Oozytengewinnungsrate wird mit 16 % (Vogelsang et al. 1988; Hinrichs et al. 1990) bis 38 % (Palmer et al. 1986; Vogelsang et al. 1986) angegeben. Die Follikelflüssigkeit kann zu 92 % aspiriert werden (Palmer et al. 1986). Zur Stimulation der Follikelreifung ist die intravenöse Verabreichung von hCG in einer Dosis von 2000 IU möglich (Hinrichs und Kenney 1987;

Palmer et al. 1987; Vogelsang et al. 1988; Hinrichs et al. 1990). Die Injektion erfolgt, wenn der präovulatorische Follikel eine Größe von 35 mm erreicht hat (Hinrichs und Kenney 1987) bzw. wenn dessen Dominanz festgestellt wurde (Palmer et al. 1986). Die Punktion erfolgt dann 28 bis 36 Stunden nach hCG Applikation (Hinrichs und Kenney 1987; Palmer et al. 1987), es wird jedoch auch von Intervallen zwischen sechs und 64 Stunden berichtet (Vogelsang et al. 1988). Weitere verwendete Hormonpräparate sind Gonadorelin (Cystorelin), Buserelin (Receptal) und Gonadotropine (Palmer et al. 1986; Palmer et al. 1987; Vogelsang et al. 1988). Durch die Verabreichung von hCG kann die Oozytengewinnungsrate auf 43 % (Vogelsang et al. 1986) bis 63 % (Palmer et al. 1987) gesteigert werden. VOGELSANG und Mitarbeiter verglichen die Wirkung verschiedener Hormonpräparate auf die Oozytengewinnungsrate (Vogelsang et al. 1988). Cystorelin wurde in einer Dosis von 2 mg, Receptal in einer Dosis von 20 µg und hCG in einer Dosis von 1000 oder 2000 IU verabreicht, wenn die Präsenz eines dominanten Follikels palpatorisch festgestellt wurde. HAP-Cystorelin (Pferdehypophysenextrakt) wurde verabreicht, um die Follikelentwicklung zu stimulieren. Die Injektion erfolgte fünf Tage lang subkutan, sobald nach einer Prostaglandinbehandlung zahlreiche kleine Follikel per Ultraschall festgestellt werden konnten. Am fünften Tag injizierten die Untersucher 1 mg Cystorelin, um 24 Stunden später die Follikelpunktionen durchzuführen. Die Ergebnisse sind Tabelle 10 zu entnehmen. Insgesamt gesehen konnte die Oozytengewinnungsrate der behandelten Stuten gegenüber der unbehandelten Stuten deutlich gesteigert werden (45 % gegenüber 16 %). Die Verabreichung von Cystorelin oder Receptal ergab in diesem Versuch bessere Ergebnisse als die Verabreichung von hCG und HAP-Cystorelin. Allerdings variieren die einzelnen Versuchsgruppen stark in ihrer Größe, ein direkter Vergleich ist dadurch schwer möglich. Die Ergebnisse bei der Verwendung von hCG sind schlechter als in bisherigen Untersuchungen.

**Tabelle 10:** Oozytengewinnung nach Stimulation der Stuten mit verschiedenen exogen zugeführten Hormonpräparaten (Vogelsang et al. 1988)

<b>Behandlung</b>	<b>Anzahl der Versuche</b>	<b>erfolgreiche Oozyten-gewinnung</b>	<b>Oozytengewinnungsrate in %</b>	<b>Anzahl der Oozyten</b>
Cystorelin	7	6	86	7
Receptal	1	1	100	2
hCG	11	2	18	2
HAP-Cystorelin (EPE)	2	1	50	1
Total	22	10	45	12

Soll das Ovar direkt von der Bauchhöhle aus manipuliert werden, muß zunächst mit einem in die craniale Vagina eingeführten Skalpell eine an die Zervix angrenzende Inzision durchgeführt werden. Der Operateur trägt sterile Handschuhe und geht manuell in die Vagina ein. Der Unterarm wird angehoben, sodaß Luft in die Vagina einströmen kann. Je nachdem, ob sich der dominante Follikel auf dem rechten oder linken Ovar befindet, befindet sich die Inzision bei zwei oder zehn Uhr zur Zervix. Diese wird dann manuell erweitert und die Hand in die Bauchhöhle eingeführt. Den Stuten wurde ein bis drei Stunden vor dem Eingriff ein Antibiotikum verabreicht (Ampicillin, 6 g i.m.), neben der Sedation ist auf ausreichende Analgesie zu achten (6-10 mg Butorphanol i.v.) (Hinrichs et al. 1990; Hinrichs 1997). In einem ersten Versuch (Hinrichs und Kenney 1987) wurde die Follikelflüssigkeit von der Flanke aus mit einer Spritze aspiriert und der Follikel anschließend drei Mal mit PBS- Lösung gespült. Vier der Stuten erhielten eine hCG-Injektion (2000 IU i.v.), als der präovulatorische Follikel eine Größe von 35 mm aufwies. Die Aspiration erfolgte dann 28 bis 32 Stunden später. Bei neun Stuten wurde die Aspiration einen Tag nachdem der präovulatorische Follikel eine Größe von 35 mm erreichte durchgeführt. Bei drei von vier bzw. sechs von neun Stuten (75 % bzw. 66,6 %) konnte eine Oozyte gewonnen werden. Von diesen neun gewonnenen Oozyten befanden sich sechs im ersten Aspirat und drei in der ersten Spüllösung, in der zweiten oder dritten Spülflüssigkeit wurden keine Oozyten gefunden. In einem weiteren Versuch wurde daraufhin nur eine Spülung pro Donor durchgeführt. Die Stuten wurden wieder in zwei Gruppen unterteilt, eine mit hCG behandelte Gruppe und eine



unbehandelte. Die Oozytengewinnungsrate lag bei sechs von neun für die behandelte und acht von elf für die unbehandelte Gruppe (66,6 % bzw. 72,7 %). Die Oozytengewinnungsrate von unbehandelten Stuten liegt bei der Kolpotomie-Methode somit deutlich höher als bei der Manipulation des Ovars vom Rektum aus. Die Ergebnisse konnten in einem weiteren Experiment durch fast gleiche Oozytengewinnungsraten (71 % für unbehandelte Stuten, 69 % für hCG behandelte Stuten) bestätigt werden (Hinrichs et al. 1990). Die Aspiration erfolgte hierbei mit einer Vakuumpumpe mit anschließender einmaliger Spülung mit 30 ml modifizierter PBS. Die Stuten tolerieren den Eingriff problemlos, die Heilung der vaginalen Inzision ohne Naht verläuft rasch. Der Vorteil der Kolpotomie-Methode besteht darin, daß das Ovar besser manipuliert und der Follikel gründlich massiert werden kann, um die Oocyte von der inneren Follikelwand zu trennen. Behinderungen durch die Darmwand oder die Darmperistaltik fehlen, ebenso die Gefahr, den Darm zu punktieren. Einige Stuten entwickeln Fibrosen an der Inzisionsstelle der cranialen Vagina, ansonsten wurden keine Nebenwirkungen bei wiederholter Kolpotomie beobachtet. Es besteht jedoch die Gefahr, während des Eingriffs ein Blutgefäß (Aorta, A. iliaca interna), den Darm oder ein anderes Abdominalorgan zu beschädigen. Auch die Entwicklung einer Peritonitis oder die Eviszeration durch die Inzisionsstelle sind mögliche Komplikationen (Hinrichs et al. 1990; Hinrichs 1997).

### **9.3 Transvaginale Follikelpunktion**

Obwohl durch die transkutane Follikelpunktion von der Flanke aus die Möglichkeit bestand, Oozyten zu gewinnen, stellt die Wiederholbarkeit der Methode bei wertvollen Spendern ein Problem dar. So begann man kurz nach der Einführung der transvaginalen Follikelpunktion beim Rind mit entsprechenden Untersuchungen bei der Stute (Squires und Cook 1996). BRÜCK und Mitarbeiter führten die ersten Versuche mit dieser Technik bei der Stute durch (Brück et al. 1992). Die transvaginale Follikelpunktion wird nach Sedation und Antibiotikagabe ebenfalls in einem Untersuchungsstand an der stehenden Stute durchgeführt. Der Schweif wird umwickelt und zur Seite gebunden, das Perineum wird mit einer jodhaltigen Reinigungslösung gewaschen und dann getrocknet. Man verwendet ein Ultraschallgerät mit spezieller Sonde und einem Führungskanal für die Punktionsnadel. Für manche Geräte sind Adapter erhältlich, welche transrektale Sonden starr umschließen und auch einen Führungskanal für die Punktionsnadel besitzen. Die Angaben über den

verwendeten Frequenzbereich variieren zwischen 5 MHz (Carnevale und Ginther 1993; Cook et al. 1993; Dippert et al. 1994), 6 MHz (Brück et al. 1992) und 6,5 MHz (Becker et al. 1997). Die transvaginale Sonde sollte steril sein, um möglichst wenige Mikroorganismen in die Vagina einzubringen. Auch die Nadel ist steril zu halten, um die Gefahr des Einschleppens von Mikroorganismen in die Bauchhöhle und die Follikelhöhle zu minimieren. Da die Sonden jedoch nicht im Autoklaven sterilisierbar sind empfiehlt es sich, diese in kalter Sterilisationsflüssigkeit einzuweichen, wobei diese schon in geringen Mengen toxisch für Oozyten ist. Mehrmalige gründliche Spülung mit steriler Kochsalzlösung ist nicht immer ausreichend, um die Sterilisationsflüssigkeit komplett zu entfernen. Alternativ kann die Sonde nach Reinigung mit einem sterilen Latexüberzug bedeckt werden. Auch das verwendete Kontaktgel sollte steril sein. Die Sonde wird in die craniale Vagina eingeführt, das Ovar vom Rektum aus erfaßt und so an die Sonde herangeführt, daß es auf dem Monitor gut darzustellen ist. Spezialisierte Sonden haben eine auf dem Bildschirm sichtbare Punktionslinie, welche den Punktionsweg der Nadel andeutet. Die Punktionslinie wird so gelegt, daß sie bis in das Zentrum des zu punktierenden Follikels reicht. Dann wird die Punktion unter Ultraschallkontrolle durchgeführt (Hinrichs 1997). Die Länge der verwendeten Nadeln beträgt 50 cm (Brück et al. 1992) bis 60 cm (Hinrichs 1997), der Durchmesser wird mit 12 G (Cook et al. 1992; Meintjes et al. 1994), 15 G (Bracher et al. 1993) und 16 G (Cook et al. 1992; Carnevale und Ginther 1993) angegeben. Dabei können die Nadeln je nach Art der Aspiration bzw. Spülung ein- oder doppelumig sein.

BRÜCK und Mitarbeiter verwendeten eine Sektorsonde von länglicher, fingerähnlicher Gestalt, an welcher ein Führungskanal für die Nadel befestigt war (Brück et al. 1992). Es wurden vier reife Follikel mit einem Durchmesser von 30 – 37 mm punktiert, aspiriert und bis zu drei Mal mit PBS gespült. Zur Aspiration wurde eine 50 ml Spritze verwendet. In drei Fällen wurde den Stuten 20 bis 30 Stunden vor der Aspiration 3000 IE hCG verabreicht. Die Dauer für die Aspiration betrug zwischen 15 und 30 Minuten. Es wurde pro Follikel zwischen 12 und 25 ml Follikelflüssigkeit aspiriert, von den vier punktierten Follikeln konnte eine Oocyte gewonnen werden.

Weitere Untersuchungen wurden durchgeführt, um die Techniken für die routinemäßige transvaginale Gewinnung von Oozyten zu etablieren. Die Verwendung einer 5 MHz Linearsonde, wie sie auch häufig für die transrektale Untersuchung des Reproduktionstraktes benutzt wird, wurde von CARNEVALE und GINTHER untersucht (Carnevale und Ginther 1993). Hierfür wird die Sonde in ein starres Gestell mit Nadelführungskanal eingefügt und so in die Vagina eingeführt, daß sie nach dorsal zu liegen

kommt. Es wurden im Östrus Follikel mit einem Durchmesser von über 30 cm, 17 bis 28 Stunden nach einer hCG Injektion (1500 IE), aspiriert. Hierzu wurde eine 16 G Nadel und eine Vakuumpumpe verwendet. Der Follikel wurde nach Aspiration der Flüssigkeit unter weiterem Saugen von rektal aus massiert. Die Prozedur dauerte durchschnittlich drei Minuten. Aus 18 Aspirationsversuchen konnten 14 Oozyten gewonnen werden (Gewinnungsrate 78 %). Zehn der Oozyten wurden von einem mäßigen bis gut expandierten Cumulus-Komplex umgeben, häufig hefteten auch Granulosazellen an. Zwei der Oozyten hatten nur einige Coronazellen um die Zona pellucida, die restlichen zwei besaßen einen kompakten Cumulus-Komplex. Die Linearsonde scheint somit zur Oozytenaspiration geeignet zu sein und bietet den Vorteil, daß sie in der klinischen Reproduktionsmedizin bei der Stute häufig verwendet wird.

COOK und Mitarbeiter (Cook et al. 1993) untersuchten drei grundlegende Methoden für die Aspiration von Follikeln:

1. die Aspiration während des Östrus zur Gewinnung von *in vivo* gereiften Oozyten,
2. die Aspiration im Diöstrus zur Gewinnung unreifer Oozyten und
3. die Aspiration präovulatorischer Follikel während des Östrus nach Stimulation mit equinem Hypophysenextrakt.

Die Aspiration der Follikel mit einer konvexen Linearsonde wurde in jedem Östrus und Diöstrus durchgeführt, vorausgesetzt ausreichende Follikelaktivität war vorhanden. Im Östrus wurden folgende Kriterien festgesetzt: a) ein oder mehrere Follikel über 35 mm und b) Rosse der Stute und / oder das Vorhandensein von Schleimhautfalten des Endometriums und / oder eine weiche Zervix. Den Stuten wurde dann eine Injektion von 3300 IE hCG i.v. verabreicht oder 2,2 mg des GnRH-Agonisten Deslorelin s.c. und der präovulatorische Follikel nach  $36 \pm 6$  h aspiriert. Hierzu wurden drei verschiedene Techniken getestet:

1. Aspiration und mindestens dreimalige Spülung mit einer einlumigen 12 G Nadel,
2. Technik wie bei 1, jedoch wurde durch die Kanüle eine Drahtschlinge geschoben und gedreht, um die Cumuluszellen zu lösen und
3. Aspiration und anschließende kontinuierliche Spülung für 2 bis 4 Minuten mit einer doppelumigen 12 G Nadel. Als Spülflüssigkeit wurde PBS + 1 % Heparin + 10 % fetales Kälberserum verwendet, welche mit einem Infusionsgerät und einem Druck von 300 mm Hg eingebracht wurde.

Die effizienteste Methode war Technik 3, die Ergebnisse sind Tabelle 11 zu entnehmen.

**Tabelle 11:** Oozytengewinnung aus präovulatorischen Follikeln von Stuten im Östrus  
(Cook et al. 1993)

	Technik 1			Technik 2	Technik 3		
	hCG	GnRH	total	GnRH	hCG	GnRH	total
Anzahl der Aspirationsversuche	18	29	47	9	21	22	43
Anzahl der Oozyten	9	15	24	2	18	18	36
Gewinnungsrate in %	50	52	51	22	86	82	84

Im Diöstrus wurden die Aspirationsversuche am Tag 7 und 10 post ovulationem durchgeführt, vorausgesetzt vier Follikel mit einem Durchmesser von 10 – 20 mm waren vorhanden. Es wurden zwei Techniken angewendet:

1. Aspiration mit einer einlumigen 16 G Nadel ohne Spülung und
2. Aspiration und kontinuierliche Spülung mit einer zweilumigen 16 G Nadel.

Da bei der Aspiration im Diöstrus häufig Blutungen auftreten, mußte die Nadel häufig mit heparinisierter PBS gespült werden. Die Oozytengewinnungsrate war im Diöstrus geringer als bei der Aspiration im Östrus (22 % gegenüber 63 %), was von den Ergebnissen anderer Untersucher (31 % im Diöstrus, 50,7 % im Östrus) unterstützt wird (Franz et al. 2001). Die beiden unterschiedlichen Techniken ergaben dabei gleiche Gewinnungsraten ( $P > 0,05$ ), wobei die Gewinnungsrate für Technik 2 bessere Ergebnisse für Follikel mit einem Durchmesser  $\leq 15$  mm ergab (siehe auch Tabelle 12).

**Tabelle 12:** Aspiration von Follikeln bei Stuten im Diöstrus (Cook et al. 1993)

	Technik 1	Technik 2 Follikelgröße in mm			total
		$\leq 15$	$\geq 20$	total	
Anzahl der Aspirationsversuche	167	118	38	156	323
Anzahl der Oozyten	32	36	3	39	71
Gewinnungsrate %	19	31	8	25	22

Die Aspiration der Follikel im Diöstrus war zeitaufwendiger ( $\varnothing$  20 min.) als während des Östrus ( $\varnothing$  5 min.) und der Eingriff schien nach der Aspiration einiger Follikel von einem Ovar schmerzhaft zu werden (Cook et al. 1992; Cook et al. 1993). Die kleineren Follikel sind häufig in der Tiefe des Ovars lokalisiert und erfordern eine Penetration des Stromas.

Fünfzehn Stuten wurden mit equinem Hypophysenextrakt (EPE) stimuliert (Cook et al. 1993). Sie erhielten 40 mg EPE täglich i.m. ab >7 Tage post ovulationem, sobald über vier Follikel mit einem Durchmesser von 10 – 15 mm vorhanden waren. Die Injektionen wurden fortgeführt, bis mehr als zwei Follikel einen Durchmesser von über 35 mm erreicht hatten. Dann erhielten die Stuten eine der drei Injektionen: 3300 IU hCG i.v., 2,2 mg GnRH-Analogum s.c. oder 80 mg EPE i.m.. Die Aspirationen wurden  $36 \pm 6$  Stunden später durchgeführt. Die höchste Gewinnungsrate wurde bei hCG behandelten Stuten erreicht (82 %), gefolgt von EPE (63 %). Nach Applikation eines GnRH-Analogums konnte nur eine Gewinnungsrate von 47 % erreicht werden, wobei dies evtl. auch auf individuelle Eigenschaften der Stuten zurückzuführen ist. Insgesamt bleibt allerdings festzustellen, daß durch die Stimulation der Stuten keine höhere Oozytengewinnungsrate zu erreichen war als bei der Aspiration der Follikel im Östrus ohne Stimulation (82 % nach EPE und hCG gegenüber 86 % bei Technik 3 nach hCG). Diese Feststellung kann durch die Ergebnisse weiterer Untersucher unterstützt werden (Franz et al. 2001). Die Oozytengewinnungsrate wird hier mit 31,6 % für EPE - behandelte Stuten und 30,6 % für unbehandelte Stuten angegeben. Die Qualität aller gewonnenen Oozyten ist aus Tabelle 13 ersichtlich.

**Tabelle 13:** Qualität der im Östrus, Diöstrus und von stimulierten Stuten gewonnenen Oozyten (Angaben in %) (Cook et al. 1993)

	Diöstrus	Östrus		Stimulation		
		hCG <sup>a</sup>	GnRH <sup>b</sup>	hCG <sup>a</sup>	GnRH <sup>b</sup>	EPE <sup>c</sup>
Anzahl	71	27	35	9	8	5
Qualität						
sehr gut	27	67	66	67	37	40
gut	51	22	26	33	25	40
schlecht	23	11	9	0	38	20

<sup>a</sup>= 3300 IU i.v., <sup>b</sup>= Deslorelin 2,2 mg s.c., <sup>c</sup>= 80 mg EPE i.m.

Die meisten im Östrus gewonnenen Oozyten zeigten eine sehr gute bis gute Qualität, ebenso Oozyten von mit hCG stimulierten Stuten. Dagegen war die Qualität von mit GnRH oder EPE

stimulierten Stuten eher gleichmäßig auf die drei Qualitätstypen (sehr gut, gut und schlecht) verteilt. Viele der im Diöstrus gewonnenen Oozyten könnten von atretischen Follikeln stammen und deshalb eine verminderte Qualität zeigen (Cook et al. 1993).

Wiederholte Follikelpunktionen bei fünf Warmblutstuten über drei Monate während der physiologischen Zuchtsaison wurden von BRACHER und Mitarbeitern durchgeführt (Bracher et al. 1993). Unabhängig vom Zyklusstand wurden in 24 Aspirationssitzungen (vier bis sieben / Stute) 200 Follikel aspiriert und 34 Oozyten gewonnen. Die Aspiration wurde durchgeführt, sobald mindestens vier Follikel bei der transrektalen Ultraschalluntersuchung auf dem Ovar zu sehen waren. Hierfür wurde im ersten Abschnitt des Versuchs eine einlumige Nadel verwendet. Die Follikel wurden abhängig vom Follikeldurchmesser und von der Möglichkeit der Ovarfixation entweder nur aspiriert (Durchmesser  $\leq 15$  mm), mit der gewonnenen Follikelflüssigkeit gespült oder ein- bis dreimal mit PBS gespült. Im zweiten Abschnitt des Versuchs wurde eine zweilumige Nadel verwendet und der Follikel kontinuierlich gespült (Vakuumpumpe mit einem Druck von 60 – 200 mmHg), Follikel mit einem Durchmesser  $\leq 10$  mm wurden nur aspiriert. Jede Stute wurde vier- bis siebenmal unter verschiedenen Bedingungen verwendet: im Östrus, im Diöstrus, ohne Hormonbehandlung und mit Hormonbehandlung a) 0,45 mg PGF<sub>2α</sub>-Analogum (Tiaprost) i.m. oder b) 3000 IU hCG i.v. 24 bis 36 h vor der Punktion. Es wurde ein 7,5 MHz Sektorscanner benutzt.

Die Oozytengewinnungsrate betrug für die Aspiration mit der einlumigen Nadel 12,3 % (15 Oozyten / 122 Follikeln) und für die doppelumige Nadel 24,4 % (19 Oozyten / 78 Follikeln). Die beste Gewinnungsrate wurde mit 35,3 % mit der doppelumigen Nadel ohne Hormonbehandlung erreicht, welche jedoch unter den Ergebnissen von COOK und Mitarbeitern bleibt (Cook et al. 1993). Im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Untersucher (Cook et al. 1993; Kanitz et al. 1997) wurde die Oozytengewinnungsrate nicht vom Zyklusstadium der Stuten beeinflusst (14,1 % im Östrus, 19,8 % im Diöstrus), die Behandlung mit Prostaglandin oder hCG konnte die Gewinnungsrate nicht verbessern (8,2 % bzw. 15,3 %). Es gab in dieser Untersuchung keinen deutlichen Unterschied in der Oozytengewinnungsrate von kleinen gegenüber großen Follikeln, wohingegen andere Untersucher einen deutlichen Einfluß der Follikelgröße auf die Oozytengewinnungsrate feststellen konnten (Dippert et al. 1994; Kanitz et al. 1997). Bei der Follikelaspiration während des Östrus erreichten vier von fünf Stuten innerhalb von null bis sechs Tagen physiologische Plasma-Progesteron-Werte von  $> 1$  ng/ml, wie sie auch nach der Ovulation

erreicht werden, was auf eine Luteinisierung der Follikel schließen läßt. Auch Corpora lutea konnten nach Punktion mittels Ultraschall beobachtet werden (Bracher et al. 1993).

Durch die Elimination des dominanten Follikels und Aspiration der anderen Follikel drei Tage später konnte die Oozytengewinnungsrate in einem Experiment von 22 % auf 35 % gesteigert werden (Dippert et al. 1994). Hierbei war die Gewinnungsrate für Follikel mit einem Durchmesser von 13 bis 17 mm höher (35 %) als für jene mit einem Durchmesser von  $> 27$  mm (13 %). Die Definition des dominanten Follikels erfolgte durch die Größe ( $\geq 25$  mm) und durch die konstante Zunahme der Größe für zwei aufeinanderfolgende Tage, während untergeordnete Follikeln ( $< 25$  mm) während der gleichen Zeit entweder an Größe verloren oder gleich groß blieben. Die Punktion erfolgte mit einer 12 G Nadel und einer Vakuumpumpe mit einem Druck von 300 mmHG. Die drei- bis fünfmalige Spülung erfolgte mit PBS + 1 % fetales Kälberserum + 1 % Heparin. KANITZ und Mitarbeiter konnten ebenfalls einen signifikanten Einfluß des Follikeldurchmessers auf die Oozytengewinnungsrate feststellen (Kanitz et al. 1997). Die Ergebnisse sind Tabelle 14 zu entnehmen.

**Tabelle 14:** Ergebnisse der Follikelaspiration in Abhängigkeit vom Follikeldurchmesser (Kanitz et al. 1997)

	Follikeldurchmesser (mm)			
	$< 10$	10 - 20	21 - 30	$> 30$
punktierte Follikel (n)	72	219	29	12
gewonnene Oozyten (n)	28	62	2	1
Gewinnungsrate (%)	38,9 <sup>a</sup>	28,3 <sup>a</sup>	6,9 <sup>b</sup>	8,3

<sup>a,b</sup>  $p < 0,05$

Zudem wurde die Gewinnungsrate auch vom Zyklusstadium beeinflusst. Zu Beginn des Zyklus und bei azyklischen Stuten außerhalb der Reproduktionsperiode konnten prozentual mehr Cumulus-Oozyten-Komplexe gewonnen werden als in der Zyklusmitte. So betrug die Oozytengewinnungsrate am Zyklustag 5: 26,3 %, am Zyklustag 12: 12,4 % und bei azyklischen Stuten 40,4 %. Im Durchschnitt wurden  $12,3 \pm 8,7$  Follikel je Stute und Aspirationssitzung aspiriert, von welchen  $3,4 \pm 1,5$  Oozyten isoliert werden konnten. Interessante Ergebnisse konnten aus der wiederholten Follikelaspiration bei sechs Dauerspenderinnen gewonnen werden. Die Oozytengewinnung wurde hierbei im Abstand von 6,6 Tagen durchgeführt. Durch die wiederholte Follikelaspiration erhöhte sich der Anteil von

Cumulus-Oozyten-Komplexen (COCs) mit kompaktem Cumuluszellverband deutlich von 28,8 % auf 49,3 % nach wiederholter Aspiration (Kanitz et al. 1997). Die wesentliche Ursache für dieses Geschehen wird darin gesehen, daß nach wiederholter Aspiration ständig neue Follikel mit einem Durchmesser von  $\geq 10$  mm heranwachsen. Es wird angenommen, daß so vorwiegend wachsende Follikel aspiriert werden, die nicht unter dem Einfluß großer dominanter Follikel oder präovulatorischer LH-Konzentrationen gestanden haben. Wachsende Follikel  $\geq 10$  mm sollen vorwiegend COCs mit kompaktem Cumuluszellverband enthalten. In einer weiteren Publikation desselben Instituts wird ein Intervall von acht Tagen zwischen den Punktionen empfohlen, um COCs hoher Qualität zu erhalten (Becker et al. 1997).

Auch trächtige Stuten sind zur Oozytengewinnung geeignet. Die Stuten werden während der ersten Hälfte der Gestation (Tag 20 bis 150 (Meintjes et al. 1994) bzw. Tag 50 bis 85 (Franz et al. 2001)) zur Aspiration herangezogen. MEINTJES und Mitarbeiter aspirierten, sobald ein oder mehr Follikel einen Durchmesser von  $\geq 25$  mm oder drei oder mehr Follikel einen Durchmesser von  $\geq 15$  mm aufwiesen, FRANZ und Mitarbeiter bei Vorhandensein von vier oder mehr Follikeln mit einem Durchmesser von  $> 12$  mm. Zur Punktion wurde eine einlumige 12 G Nadel verwendet, bei den vier bis zehn Spülungen wurde die Spülflüssigkeit von Hand eingebracht und mit einer Vakuumpumpe mit einem Druck von 90 mmHg wieder entfernt (Meintjes et al. 1994). Alle Stuten wurden mindestens dreimal zur Aspiration herangezogen. Durchschnittlich wurden so pro Stute 5,7 Aspirationen durchgeführt, 25,9 Follikel pro Stute erfolgreich gespült und 15,2 Oozyten pro Stute gewonnen, ohne daß eine der Stuten abortierte (Meintjes et al. 1994). Die Gewinnungsrate an Oozyten lag somit höher, als man sie bei Stuten im Zyklus erwarten würde. 91 % der insgesamt 152 gewonnenen Oozyten wurden von Corona radiata / Cumulus- Zellen umgeben, 9 % wurden als degeneriert eingestuft.

FRANZ und Mitarbeiter verwendeten zur Aspiration der Follikel trächtiger Stuten eine doppelumige 17 G Nadel. Die Follikel wurden zweimal mit PBS + 1 % Heparin + 10 % Kälbeserum + 1 % Penicillin - Streptomycin gespült, wobei das Medium mit einer 60 ml Spritze infundiert und mit einer Vakuumpumpe mit einem Druck von 150 mmHg wieder aspiriert wurde. Die Oozytengewinnungsrate lag bei 52,8 % und somit ebenso hoch als bei einer Aspiration im Östrus (50,7 %). Oozyten aus Follikeln mit einem Durchmesser von  $< 15$  mm waren eher von einem kompakten Cumulus umgeben, während solche aus Follikeln  $> 15$  mm eher von einem expandierten Cumulus umgeben waren. Der expandierte Cumulus zeigte morphologisch allerdings einen pyknotischen, heterogenen Aspekt im Gegensatz zum



weichen, homogenen Aussehen des Cumulus von im Östrus gewonnenen Oozyten. Schon in vorherigen Studien wurde festgestellt, daß ca. 40 % der von trächtigen Stuten gewonnenen Oozyten atretisch sind (Meintjes et al. 1994). Um die Aspiration von Oozyten aus atretischen Follikeln zu vermeiden, sollten die Follikel zunächst einmal aspiriert werden, um einer neuen Kohorte von Follikeln das Wachstum zu ermöglichen, die dann für die Oozytengewinnung genutzt werden. Dann könnte vielleicht auch die schlechtere Reifungsrate dieser Oozyten gegenüber im Diöstrus gewonnenen Oozyten *in vitro* verbessert werden (Franz et al. 2001).

#### 9.4 Oozytengewinnung aus isolierten Ovarien ( Schlachthofovarien )

Oozyten aus Ovarien geschlachteter Stuten werden häufig verwendet, um über die *in vitro* Reifung und Fertilisation zu forschen. Bei Rindern konnte eine Verbindung zwischen der Morphologie der gewonnenen Cumulus-Oozyten-Komplexe und der Entwicklungsfähigkeit der Oozyten beobachtet werden. Die Selektion der Oozyten über ihre Morphologie ist ein wichtiges Kriterium, um einen möglichst hohen Prozentsatz an Oozyten zu haben, die sich nach *in vitro*-Fertilisation zur Blastozyste entwickeln (Yang und Lu 1990). Desweiteren konnte man feststellen, daß die Cumulusmorphologie der gewonnenen Oozyten mit der Größe der Follikel in Verbindung steht. Dabei zeigten Follikel > 3 mm Durchmesser einen größeren Anteil an degenerierten Oozyten (Leibfried und First 1979). Die durchschnittliche Anzahl an Follikeln liegt bei der Stute pro Ovar bei ungefähr sechs und ist somit relativ niedrig (Hinrichs und DiGiorgio 1991; Hinrichs et al. 1993). Zusammen mit der geringen Anzahl an Schlachttieren ist die Verfügbarkeit von Pferdeoozyten für die Forschung, verglichen mit den meisten anderen Tierarten, daher eher schlecht.

Die Oozytengewinnung durch die Aspiration der Follikel mit Kanüle und Spritze ergibt nur eine relativ geringe Oozytengewinnungsrate, viele der gewonnenen Oozyten werden dabei einem Großteil ihrer Cumuluszellen beraubt (Okolski et al. 1987; Hinrichs 1991; Alm et al. 1997). HINRICHS untersuchte die Verbindung zwischen der Lebensfähigkeit der Follikel und der Follikelgröße und zwischen der Follikelgröße, der Oozytengewinnungsrate und den morphologischen Charakteristiken der gewonnenen COCs (Hinrichs 1991). Die Oozyten wurden innerhalb von drei Stunden nach der Entfernung der Ovarien durch Aspiration gewonnen. Hierzu wurde eine 18 G Nadel mit einer 10 ml Spritze verwendet, die Follikel wurden nicht gespült. Nachdem alle auf der Oberfläche sichtbaren Follikel aspiriert waren, aspirierte man nach der Teilung des Ovars in 1 cm große Scheiben

die dadurch sichtbar gewordenen Follikel auf gleiche Weise. Bei der Teilung geöffnete Follikel wurden mit physiologischer Kochsalzlösung ausgespült. Der Inhalt der Follikel wurde separat in Petrischalen aufgefangen. Die COCs wurden mit Hilfe eines Mikroskopes (Vergrößerung 20 – 70x) lokalisiert und die Morphologie des Cumulus beurteilt. Danach fixierte man die COCs mit 3:1 Ethylazetat, die Färbung zur Beurteilung der Kernreifung erfolgte mit 2 % Azetorzein. Von der Follikelwand wurden mikroskopische Schnitte angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Die Beurteilung erfolgte bei einer Vergrößerung von 25 – 400x nach dem System von Rajakoski (Rajakoski 1960) modifiziert nach Kenney und Mitarbeitern (Kenney et al. 1979):

- lebensfähige Follikel ohne degenerative Veränderungen,
- Atresie Stufe I mit gelegentlich pyknotischen Kernen bei sonst normalen Granulosazellen,
- Atresie Stufe II mit massiver Pyknose und Karyorhexis oder
- Atresie Stufe III mit dem Verlust der Granulosa und dem Vorhandensein einer verdickten, hyalinisierten Basalmembran.

Da von 142 untersuchten Follikeln nur zehn in die Kategorie Atresie Stufe I einzuordnen waren, wurden diese zur Kategorie „Lebensfähige Follikel“ eingeordnet. Follikel der Stufe II und III wurden als atretisch betrachtet. Die Ergebnisse der Untersuchung sind Tabelle 15 zu entnehmen. Die Anzahl lebensfähiger Follikel stieg mit der Zunahme des Durchmessers der Follikel an.

**Tabelle 15:** Durchmesser der Follikel und Anteil lebensfähiger und atretischer Follikel (Hinrichs 1991)

Follikeldurchmesser in mm	Anzahl (n)	lebensfähig	atretisch
≤ 4	17	24 %	76 %
5 - 9	31	19 %	81 %
10 - 19	60	42 %	58 %
≥ 20	24	83 %	17 %

Die Oozytengewinnungsrate lag insgesamt bei 46 %. Dabei gab es keinen Unterschied zwischen lebensfähigen und atretischen Follikeln. Die morphologische Einteilung des Cumulus erfolgte in fünf Stufen:

- kompletter Cumulus, die Oocyte wird von vier oder mehr Schichten kompakter Cumuluszellen umgeben,
- teilweiser Cumulus, Areale kompakter Cumuluszellen sind an der Oocyte angeheftet,
- nur die Corona radiata ist vorhanden,
- kein Cumulus und keine Corona radiata ist vorhanden,
- expandierter, pyknotischer Cumulus.

Das Ooplasma wurde morphologisch in drei Klassen unterteilt:

- granuläre, diffuse und gleichmäßige Erscheinung, die meisten Oocyten dieser Kategorie besaßen eine ungleichmäßige Färbung des Ooplasmas,
- klumpige, dunkle und grobe granuläre Erscheinung,
- von der Zona pellucida getrenntes, mißgestaltetes und / oder dichtes Ooplasma.

99 Oocyten wurden klassifiziert. Granuläres Ooplasma wurde häufiger bei Oocyten aus lebensfähigen als aus atretischen Follikeln festgestellt. Dagegen wurde unregelmäßiges und / oder dichtes Ooplasma in deutlich mehr Oocyten aus atretischen als aus lebensfähigen Follikeln gefunden. Oocyten aus atretischen Follikeln zeigten häufig expandierte oder pyknotische Cumuluszellen. Viele Oocyten waren nur von Zellen der Corona radiata umgeben (Hinrichs 1991). Die Ergebnisse sind Tabelle 16 zu entnehmen.

**Tabelle 16:** Morphologie der COCs in Verbindung zur Lebensfähigkeit der Follikel (Hinrichs 1991)

<b>Ooplasma</b>	<b>lebensfähig (n=33)</b>	<b>atretisch (n=66)</b>
granulär	64 %	39 % <sup>a</sup>
klumpig	30 %	38 %
mißgebildet, dicht	6 %	23 % <sup>a</sup>
<b>Cumulus</b>	<b>lebensfähig (n=35)</b>	<b>atretisch (n=67)</b>
komplett	11 %	9 %
partiell	17 %	15 %
nur Corona radiata	63 %	48 %
kein Cumulus od. Corona radiata	3 %	5 %
expandiert / pyknotisch	6 %	24 % <sup>a</sup>

<sup>a</sup> unterscheidet sich deutlich von den lebensfähigen Follikeln ( $P < 0,05$ )

Die Morphologie der COCs wurde auch noch in Beziehung zum Follikeldurchmesser gesetzt (Tabelle 17). Der prozentuale Anteil an Oocyten mit unregelmäßigem / dichtem Ooplasma

oder mit expandiertem / pyknotischem Cumulus nahm mit der Zunahme der Follikelgröße ab. Dies reflektiert den höheren Anteil lebensfähiger Follikel bei zunehmender Größe.

**Tabelle 17:** Morphologie der COCs im Vergleich zur Follikelgröße (Hinrichs 1991)

	≤ 4 mm	5 – 9 mm	10 – 19 mm	≥20 mm
<b>Ooplasma</b>	<b>n = 19</b>	<b>n = 18</b>	<b>n = 40</b>	<b>n = 18</b>
granulär	42 %	28 %	50 %	67 %
klumpig	26 %	39 %	38 %	33 %
mißgebildet / dicht	32 % <sup>a</sup>	33 % <sup>a</sup>	13 % <sup>a,b</sup>	0 % <sup>b</sup>
<b>Cumulus</b>	<b>n = 20</b>	<b>n = 19</b>	<b>n = 40</b>	<b>n = 19</b>
komplett	10 %	21 %	7 %	21 %
partiell	20 %	16 %	17 %	11 %
nur Corona radiata	20 %	26 %	65 %	68 %
kein Cumulus oder Corona radiata	10 %	11 %	0 %	0 %
expandiert / pyknotisch	40 % <sup>a</sup>	26 % <sup>a,b</sup>	10 % <sup>b,c</sup>	0 % <sup>c</sup>

In den Reihen zeigen die Werte mit unterschiedlichen Buchstaben eine deutliche Abweichung.

Der geringe Prozentsatz an Oozyten, welche mit intaktem Cumulus gewonnen werden konnten, läßt vermuten, daß dieser bei Stuten durch die Aspiration beschädigt wird. Dies könnte damit zusammen hängen, daß der COC bei Stuten über einen Hügel mit breiter Basis in der Granulosa befestigt ist. Während die meisten Cumuluszellen bei der Aspiration von der Oozyte abgerissen werden, war die Corona radiata sehr zäh und ließ sich durch gewöhnlich verwendete Techniken wie Pipettieren oder Manipulation mit Nadeln nicht von der Oozyte trennen.

Die Morphologie der aspirierten COCs stand im Bezug zur Lebensfähigkeit der Follikel. Ein deutlich höherer Anteil der Oozyten lebensfähiger Follikel zeigte granuläres Ooplasma. Das Zytoplasma dieser Oozyten hatte Bereiche dunkler und hellerer Granulation, welche den hohen Anteil an Lipiden in Pferdeoozyten reflektieren könnten (Vogelsang et al. 1987). Während die unebene Erscheinung des Ooplasmas bei bovinen Oozyten als Anzeichen der Degeneration interpretiert wird, war dies die häufigste morphologische Erscheinung bei Oozyten lebensfähiger Follikel und kann auch in reifen präovulatorischen Pferdeoozyten beobachtet werden. Oozyten von atretischen Follikeln tendierten eher dazu, unregelmäßiges und / oder dichtes Ooplasma und expandierte, pyknotische Cumuluszellen zu zeigen als

Oozyten von lebensfähigen Follikeln. Allerdings kann von der Morphologie der Oocyte nicht direkt auf den morphologischen Zustand des Follikels geschlossen werden, was auch mit der Zerstörung des Cumulus oophorus während der Aspiration begründet werden könnte (Hinrichs 1991). Die Gewinnung scheinbar „normaler“ Oozyten aus atretischen Follikeln beim Pferd ist allerdings auch vereinbar mit Befunden beim Rind. Demnach könnte die Oozytendegeneration erst nach dem Einsetzen der Follikelatresie beginnen (Rajakoski 1960; Marion et al. 1968).

Anscheinend hat auch die Zeitspanne zwischen der Gewinnung der Ovarien und der Aspiration der Follikel sowie die Temperatur während der Lagerung Einfluß auf die Oozytengewinnungsrate (Guignot et al. 1999). So lag diese bei kurzer Lagerung (1,5 bis vier Stunden) mit einem Temperaturabfall von 37°C auf 32°C bei 35 %. Deutlich höher fiel dagegen die Oozytengewinnungsrate (48 %) bei langer Lagerung (sechs bis acht Stunden) und einem Temperaturabfall von 37°C auf 27,5°C aus. Es scheint, daß die COCs bei längerer Lagerung weniger fest an der Follikelwand anhaften. Zudem konnte beobachtet werden, daß 56 % der nach kurzer Lagerung gewonnenen COCs einen kompletten oder partiellen Cumulus besaßen, während nur 12 % allein mit der Corona radiata gewonnen wurden. Dieser Kontrast zu den Ergebnissen von HINRICHS 1991 könnte durch die unterschiedliche Aspirationsmethode erklärt werden. Während HINRICHS mit einer Spritze aspirierte, wobei das erzeugte Vakuum variabel ausfällt, wurde von GUIGNOT und Mitarbeitern ein konstantes Vakuum von 40 mmHg zur Aspiration angewendet. Die Morphologie der gewonnenen COCs wurde jedoch nicht durch eine unterschiedliche Dauer der Lagerung beeinflusst (siehe Tabelle 18).

**Tabelle 18:** Oozytengewinnungsrate und Qualität der Oozyten von Stutenovarien, welche einer kurzen (1,5 – 4 h) und einer langen (6 – 8,5 h) Lagerungsdauer nach der Gewinnung am Schlachthof unterworfen waren (Guignot et al. 1999)

	<b>19 Lagerungszeit</b>	
	<b>kurz</b>	<b>lang</b>
gewonnene Ovarien: n	16	16
gewonnene Follikel insgesamt: n	203	201
pro Ovar aspirierte Follikel	12,7 <sup>a</sup>	12,6 <sup>a</sup>
gewonnene Oozyten insgesamt: n	71	96
pro Ovar gewonnene Oozyten	4,4 <sup>a</sup>	6,0 <sup>b</sup>
pro Follikel gewonnene Oozyten	0,35 <sup>a</sup>	0,48 <sup>b</sup>
Qualität der untersuchten COCs: n (%)		
mit kompaktem, kompletten oder teilweisem Cumulus	40 (56,3)	58 (60,4)
nur Corona radiata	9 (12,7)	6 (6,3)
mit expandiertem Cumulus	18 (25,4)	26 (27,1)
kein Cumulus oder Corona radiata	4 (5,6)	6 (6,2)

<sup>a,b</sup> Werte mit verschiedenen Buchstaben zeigen eine deutliche Abweichung ( $P < 0,01$ ;  $\chi^2$ ).

Eine Oozytengewinnungsrate von 46 % konnte durch Aspiration ohne Spülung des Follikels erreicht werden (Hinrichs 1991). Der Effekt einer Spülung der Follikel auf die Oozytengewinnungsrate wurde von SHABPAREH und Mitarbeitern untersucht (Shabpareh et al. 1992; Shabpareh et al. 1993). Dabei wurden alle Follikel dreimal gespült mit dem Aspirat + 1 ml Luft + 0,5 ml eines von drei unterschiedlichen Medien : 1) Dulbecco's PBS, 2) PBS + 100 IU/ml Hyaluronidase, 3) PBS + 500 IU/ml Hyaluronidase. In einem zweiten Experiment verglich man die Ergebnisse aus 1) nur Aspiration ohne Spülung und dreimalige Spülung mit 2) PBS oder 3) PBS + 1000 IU/ml Hyaluronidase. Zwischen der dritten und vierten Aspiration verblieb das Spülmedium für jeweils 15 Sekunden im Follikel, um die Wirkung der Hyaluronidase (Lösung der Follikelzellen) zu gewährleisten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 19 aufgeführt.

**Tabelle 19:** Oozytengewinnungsrate in Prozent bei der Verwendung des unverdünnten Aspirats und PBS mit oder ohne Hyaluronidase (Shabpareh et al. 1993)

<b>20</b>		<b>PBS + Hyaluronsäure</b>			
nur Aspiration		0 IU	100 IU	500 IU	1000 IU
Experiment 1	-	40,7 (22/54)	36,0 (36/100)	45,4 (45/99)	-
Experiment 2	23,7 <sup>a</sup> (9/38)	37,5 <sup>b</sup> (27/72)	-	-	43,4 <sup>b</sup> (54/122)

<sup>a,b</sup> Werte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ( $P < 0,01$ )

Die Zugabe von Hyaluronidase führte nicht zu einer Steigerung der Oozytengewinnungsrate, allerdings zeigte sich eine Steigerung bei Spülung mit PBS mit / ohne Hyaluronidase gegenüber der alleinigen Aspiration. Die von HINRICHS (Hinrichs 1991) berichtete Oozytengewinnungsrate konnte durch die Spülung allerdings nicht übertroffen werden. Bezogen auf die Follikelgröße war die Oozytengewinnungsrate größer bei Follikeln mit einem Durchmesser unter 10 mm als bei solchen über 10 mm (Tabelle 20).

**Tabelle 20:** Auswirkung der Follikelgröße auf die Oozytengewinnungsrate in % (Shabpareh et al. 1993)

<b>21</b>		<b>Follikelgröße in mm</b>		
		< 10	11 - 20	> 20
<b>Experiment 1</b>		44,8 <sup>a</sup> (95/212)	20,0 <sup>b</sup> (6/30)	18,2 <sup>b</sup> (2/11)
<b>Experiment 2</b>		41,4 <sup>a</sup> (85/205)	19,1 <sup>b</sup> (4/21)	16,7 <sup>b</sup> (1/6)

<sup>a,b</sup> Werte innerhalb der Experimente mit unterschiedlichem Buchstaben unterscheiden sich signifikant ( $P < 0,10$ )

Die Hyaluronidase wurde eingesetzt, um die Oocyte von der Follikelwand zu lösen und so höhere Oozytengewinnungsraten zu erreichen. Dies zeigte keinen deutlichen Erfolg. Ursachen hierfür könnten zu geringe Konzentrationen des Enzyms sein. Zudem wurden die Konzentrationen unabhängig von der Größe der Follikel verwendet. Es ist deshalb möglich, daß deshalb mehr Oozyten aus Follikeln mit einer Größe < 10 mm gewonnen wurden, weil

die Konzentration an Hyaluronidase höher war als in größeren Follikeln (Shabpareh et al. 1993).

Gute Gewinnungsraten von Oozyten mit intaktem Cumulus oophorus können erreicht werden, wenn die Follikel mit einem Skalpelli geöffnet werden und man die Granulosazellschicht mit einer Kürette von den Follikeln abschabt (Hinrichs et al. 1993; Alm et al. 1997) oder man die ganzen Follikel vom Ovar abtrennt und dann rupturiert (Okolski et al. 1987; DelCampo et al. 1990; Okolski et al. 1991). Der zeitliche Aufwand erhöht sich dadurch jedoch beträchtlich. Bei einem Vergleich vier verschiedener Methoden zur Oozytengewinnung bei Stuten wurden die Oozyten 1) durch transvaginale Follikelpunktion *in vivo*, 2) durch Follikelaspiration *in vitro*, 3) durch Follikelisololation und Ruptur oder 4) durch Abschabung mit einer Kürette gewonnen (Alm et al. 1997). Dabei konnte die höchste Oozytengewinnungsrate durch die Abschabung mit der Kürette erreicht werden (71,1 %), gefolgt von der Follikelisololation und Ruptur mit 61,3 %. Die Follikelaspiration *in vitro* und *in vivo* führte zu einer Oozytengewinnungsrate von 31,2 % und 19,3 %. Der Anteil an kompakten COCs war bei der Kürettage mit 50,7 % und der Follikelisololation mit 44,5 % deutlich höher als bei der Aspiration *in vivo* und *in vitro* mit 31,9 % bzw. 23,7 %.

Bei der Follikelisololation können Follikel mit weißlichem Epithel, die eine schlechte Durchblutung zeigen, von vornherein ausgeschlossen werden (Kenney et al. 1979; Okolski et al. 1991). Trotz dieser makroskopischen Vorselektion zeigten die Ergebnisse der histologischen Untersuchung der Follikel nur 49 % normale Follikel mit deutlich definiertem Nukleus der Granulosazellen, 25 % der Follikel befanden sich im primären atretischen Stadium mit einzelnen pyknotischen Zellen und weitere 25 % der Follikel befanden sich im sekundären atretischen Stadium mit zahlreichen pyknotischen Kernen und dichten Zellteilen (atretic bodies). Die Atresie der Granulosazellen, festgestellt durch histologische Untersuchung, konnte durch eine Reduktion der Hormonspiegel von Östrogen und Testosteron in der Follikelflüssigkeit bestätigt werden (Okolski et al. 1991). Die Konzentration dieser beiden Hormone steht auch in direkter Beziehung zur Follikelgröße. So konnte die höchste Östrogenkonzentration ( $458 \pm 184$  ng/ml) in normalen Follikeln mit einem Durchmesser  $> 20$  mm gefunden werden und die niedrigste Östrogenkonzentration ( $5,6 \pm 1,7$  ng/ml) in Follikeln im zweiten Stadium der Atresie mit einem Durchmesser  $< 15$  mm. Die Konzentration an Testosteron zeigte ein Maximum ( $5,4 \pm 2,0$  ng/ml) bei normalen Follikeln  $> 15$  mm und ein Minimum ( $0,2 \pm 0,0$  ng/ml) bei kleinen Follikeln im sekundären Stadium der Atresie (siehe Tabelle 21).



**Tabelle 21:** Konzentrationen an Steroidhormonen in der Follikelflüssigkeit entsprechend des Durchmessers und der morphologischen Qualität der Follikel (nach OKOLSKI 1991)

Morphologische Qualität der Follikel					
Steroidhormon (ng/ml)*	Follikeldurchmesser Ø	normal	Atresie Stufe 1	Atresie Stufe 2	Insgesamt
<b>Östradiol</b>	1	21,3 ± 8,5 (12)	53,7 ± 32,2 (5)	5,6 ± 1,7 (4)	26,0 ± 9,8 (21)
	2	166,6 ± 78,9 (8)	65,4 ± 26,0 (3)	13,3 ± 5,6 (5)	99,7 ± 43,0 (16)
	3	458,2 ± 184,2 (4)	169,5 ± 19,7 (4)	43,1 ± 13,2 (4)	223,7 ± 79,6 (12)
	Total	142,5 ± 51,4 (24)	95,2 ± 22,3 (12)	20,1 ± 6,3 (13)	
<b>Progesteron</b>	1	27,8 ± 5,3 (12)	60,4 ± 28,8 (5)	63,4 ± 34,3 (4)	42,2 ± 10,6 (21)
	2	39,3 ± 14,5 (8)	18,5 ± 7,1 (3)	22,8 ± 10,5 (5)	30,2 ± 8,4 (16)
	3	23,5 ± 1,6 (4)	18,2 ± 3,5 (4)	14,0 ± 1,5 (4)	18,5 ± 1,8 (12)
	Total	30,8 ± 5,5 (24)	35,8 ± 13,5 (12)	32,5 ± 12,7 (13)	
<b>Testosteron</b>	1	0,9 ± 0,2 (11) #	4,1 ± 1,4 (5)	0,2 ± 0,0 (4)	1,5 ± 0,5 (20)
	2	5,4 ± 1,3 (8)	1,8 ± 0,5 (3)	2,5 ± 1,3 (5)	3,8 ± 0,9 (16)
	3	5,4 ± 2,0 (4)	3,1 ± 1,5 (4)	3,4 ± 0,9 (4)	4,0 ± 0,9 (12)
	Total	3,2 ± 0,8 (23) #	3,2 ± 0,8 (12)	2,0 ± 0,7 (13)	
<b>Androstendion</b>	1	17,4 ± 4,5 (12)	17,5 ± 2,8 (5)	15,7 ± 2,5 (4)	17,0 ± 2,7 (21)
	2	21,9 ± 4,0 (8)	19,3 ± 4,0 (3)	15,8 ± 2,6 (5)	19,3 ± 2,4 (16)
	3	36,2 ± 13,0 (4)	20,7 ± 3,2 (4)	20,8 ± 3,4 (4)	25,8 ± 5,1 (12)
	Total	21,9 ± 3,7 (24)	18,9 ± 1,9 (12)	17,1 ± 1,7 (13)	

\*Morphologie und Durchmesser bedeutsam für Östradiol und Testosteron

Ø 1 = < 15 mm; 2 = 15 – 20 mm; 3 = > 20 mm. Die Zahl in der Klammer ist die Anzahl der Follikel.

## 9.5 Morphologie der Oozyten

Nach der Gewinnung aus dem Follikel zeigen Pferdeoozyten morphologisch zwei wichtige Cumulustypen: den kompakten (CP) und den expandierten (EX) Cumulus. Werden die Oozyten durch die Ausschabung der Follikel gewonnen, können die beiden Cumulustypen zu ungefähr gleichen Anteilen erhalten werden (Hinrichs et al. 1993; Alm et al. 1997). Hierbei stammen CP-Oozyten von sich in der Entwicklung befindenden Follikeln, während EX-Oozyten von atretischen Follikeln stammen (Hinrichs und Williams 1997). Nur ein sehr geringer Prozentsatz (<1 %) an EX-Oozyten, welche von unstimulierten, isolierten Ovarien gewonnen wurden, stammt von reifen, präovulatorischen Follikeln.

ALM und HINRICHS beobachteten, daß sich zum Zeitpunkt der Gewinnung ungefähr die gleiche Anzahl an CP- und EX-Oozyten im Keimbläschenstadium (Germinal Vesicle State, GV) befinden. Während dieses Stadiums können beim Pferd hauptsächlich zwei Chromatin-Konfigurationen auftreten: diffuses Chromatin und Chromatin in einer dichten Masse. Während die Mehrzahl der CP- als auch der EX-Oozyten während des Keimbläschenstadiums dichtes Chromatin aufweisen, enthalten 24 – 40 % der CP-Oozyten im Keimbläschenstadium diffuses Chromatin. Dieses wird in EX-Oozyten selten gesehen (Hinrichs et al. 1993). Die dichte Chromatinmasse im Keimbläschenstadium scheint mit der Fähigkeit zur Meiose verbunden zu sein (Alm und Hinrichs 1996; Hinrichs 1997). Dies zeigt an, daß CP-Oozyten eine geringere meiotische Kompetenz besitzen als EX-Oozyten, da weniger CP-Oozyten eine dichte Chromatinmasse besitzen. Allerdings steigt die Prävalenz an dichtem Chromatin mit steigender Follikelgröße; mehr als 80 % der CP-Oozyten, die aus Follikeln mit einem Durchmesser von über 20 mm gewonnen wurden, zeigen dichtes Chromatin (Hinrichs 1998).

GABLE und WOODS teilten in ihren Untersuchungen den Cumulus in fünf Typen ein: 1) kompakt, 2) leicht expandiert, 3) mittelmäßig expandiert, 4) stark expandiert und 5) entblößte Oozyte ohne Cumuluszellen. Der durch Fluoreszenz dargestellte Nukleus der Oozyten wurde wie folgt bewertet: 1) Keimbläschenstadium, 2) kondensiertes Chromatin, 3) Polkörperchen, 4) negativ (keine Fluoreszenz) oder 5) fragmentiert (Gable und Woods 2001). Von den 208 untersuchten COCs wurde der Cumulus bei 26,9 % als kompakt eingestuft, bei 17,8 % als leicht expandiert, bei 13,0 % als mittelmäßig expandiert, bei 7,2 % als stark expandiert und 35,1 % der Oozyten waren ohne Cumuluszellen. Der Nukleus dieser Oozyten befand sich bei 62,5 % im Keimbläschenstadium, bei 10,1 % war das Chromatin kondensiert, 3,8 % befanden sich im Polkörperchenstadium, 19,2 % waren negativ und 4,3 % fragmentiert.

Oozyten mit stark expandiertem Cumulus hatten häufig ein kondensiertes Chromatin. Diese Ergebnisse stehen zunächst im Kontrast zu den Ergebnissen von ALM und HINRICHS, lassen sich jedoch mit der Einteilung des expandierten Cumulus in leicht, mittelmäßig und stark in der Untersuchung von GABLE und WOODS erklären. Bei Oozyten mit kompaktem oder ohne Cumulus wurde das Polkörperchenstadium weniger häufig gefunden als bei Oozyten mit stark expandiertem Cumulus. Der Anteil nicht angefärbter Nuklei und fragmentierter Nuklei zeigte zwischen den einzelnen Cumulustypen keine Unterschiede.

Kompakte, leicht expandierte und mäßig expandierte COCs zeigten eine gleiche Häufigkeit an Nuklei im Keimbläschenstadium (75 %, 81,1 % und 59,3 %). Daher könnten diese COCs gleiche Anforderungen an die *in vitro*-Kultur stellen und für Oozytenreifungsversuche in einer Gruppe zusammengefaßt werden. Stark expandierte COCs hatten weniger Nuklei im Keimbläschenstadium, sondern eher kondensiertes Chromatin und Polkörperchen. Stark expandierte COCs werden demnach eher kürzere *in vitro*-Reifungszeiten benötigen und sollten eine separate Gruppe bilden. Diese Vorstellung stimmt mit den Ergebnissen aus der *in vitro*-Reifung von Oozyten anderer Untersucher überein (Zhang et al. 1989; Hinrichs et al. 1993).

Ungefähr ein Drittel der Oozyten (35,1 %, 73/208) wurde, vermutlich durch die Art der Manipulation bei der Gewinnung, ohne Cumuluszellen gewonnen. Die Autoren vermuten, daß es sich hierbei um eine Mischung aus Oozyten aller Cumulustypen handelt. Da sich 54,8 % dieser Oozyten im Keimbläschenstadium befanden, sollte diese beträchtliche Anzahl an Oozyten nicht vom weiteren Experiment ausgeschlossen werden. Sie sollten jedoch separat kultiviert werden, bzw. zumindest unabhängig von mit Cumuluszellen umgebenen Oozyten beurteilt werden (Gable und Woods 2001).

## 9.6 Schlußfolgerung

Oozyten können auf vier verschiedene Arten gewonnen werden: chirurgisch, durch Follikelpunktion von der Flanke aus, durch transvaginale Follikelpunktion und aus isolierten Ovarien. Die chirurgische Methode wird heute aufgrund ihrer Invasivität kaum mehr angewendet, die transvaginale Follikelpunktion wird der Follikelpunktion von der Flanke aus aufgrund besserer Wiederholbarkeit vorgezogen. Dabei wird eine Ultraschallsonde mit einem Führungskanal für die Punktionsnadel in die Vagina eingeführt. Das Ovar wird vom Rektum

aus so an die Sonde herangeführt, daß es auf dem Monitor gut darstellbar ist. Durch eine auf dem Bildschirm sichtbare Punktionslinie wird der Punktionsweg der Nadel angedeutet. Die Oozytengewinnungsrate liegt im Östrus (50 – 63 %) höher als im Diöstrus (22 – 31 %). Die Stimulation der Stuten mit EPE führt zu keiner Steigerung der Oozytengewinnungsrate. Auch trächtige Stuten können während der ersten Hälfte der Gestation zur Oozytengewinnung herangezogen werden.

Die Oozytengewinnung von isolierten Ovarien findet vor allem zu experimentellen Zwecken statt. Die Oozyten können entweder durch Aspiration, durch Ausschaben oder durch die Ruptur der Follikel gewonnen werden. Es kann eine Gewinnungsrate von ca. 30-48 % für die Aspiration, 71 % für die Ausschabung und 61 % für die Ruptur erreicht werden, wobei die Gewinnungsrate sowohl von der Zeitspanne zwischen der Gewinnung der Ovarien und der Aspiration der Follikel als auch von der Lagerungstemperatur beeinflusst wird.

Die gewonnenen Oozyten zeigen morphologisch zwei wichtige Cumulustypen: den kompakten und den expandierten Cumulus. Die Mehrzahl der Oozyten befanden sich im Keimbläschenstadium (75 %, 81,1 % und 59,3 %), nur bei Oozyten mit stark expandiertem Cumulus fand man häufiger kondensiertes Chromatin und Polkörperchen. Eine dichte Chromatinmasse im Keimbläschenstadium scheint mit der Fähigkeit zur Meiose verbunden zu sein.

## 10. Oozytenreifung *in vitro*

Die Oozytenreifung *in vitro* bietet die Möglichkeit, unreife Oozyten aus kleinen Follikeln zum Oozytentransfer, zur *in vitro*-Fertilisation und zur Mikromanipulation zu nutzen. Somit kann eine erfolgreiche *in vitro*-Reifung die Anzahl der zur Verfügung stehenden Oozyten deutlich erhöhen. Die bisherigen Studien mit Pferdeoozyten haben den Einfluß verschiedener Medien, Serumkomponenten, Hormone und somatischer Zellen sowie die unterschiedliche Kulturdauer untersucht.

### 10.1 Aufbewahrung der Oozyten bis zum Einsetzen in das Reifungsmedium

Die gewonnenen Oozyten können bis zum Einsetzen in das Reifungsmedium entweder in der Spülflüssigkeit (z.B. PBS (Shabpareh et al. 1993; Dell'Aquila et al. 1995)) oder in dem zur Kultur verwendeten Basismedium (z.B. TCM 199 (Alm und Torner 1994)), meist mit Serumzusatz, aufbewahrt werden. Auch die Aufbewahrung in der Follikelflüssigkeit ist beschrieben (Willis et al. 1991). Diese Methode hat allerdings den Nachteil, daß die Follikelflüssigkeit *in vitro* nicht die meiotische Pause zu erhalten vermag. Dagegen ist durch die Injektion von Oozyten in intakte Follikel *in vitro* eine effektive Unterdrückung der Reifung gewährleistet (Hinrichs et al. 1992). Eine weitere Möglichkeit zur reversiblen Unterdrückung der Oozytenreifung stellt die Zugabe von Cycloheximid zu einem Medium dar. Cycloheximid inhibiert die Peptidyl-Transferase und hemmt so das Wachstum durch die Blockierung der Synthese spezifischer Proteine (Alm und Hinrichs 1996). Der Erhalt der meiotischen Pause spielt dann eine Rolle, wenn Oozyten für eine gemeinsame Reifung *in vitro* gesammelt werden sollen.

### 10.2 Beurteilung der Oozytenreifung

Die Beurteilung der Oozytenreifung kann über die Untersuchung der Kernreifung, der zytoplasmatischen Reifung und der Cumuluszellexpansion durchgeführt werden.

### 10.2.1 Beurteilung der Kernreifung

Zum Zeitpunkt der Gewinnung befinden sich 65 bis 70 % der Oozyten im Keimbläschenstadium oder an dessen Ende (germinal vesicle breakdown = Abbau der Kernmembran). Während der Reifung tritt die Oocyte wieder in die Meiose ein und soll am Ende der Reifungszeit die Metaphase II erreicht haben (Squires 1996). Vor der Untersuchung der Kernreifung werden die Oozyten von den sie umgebenden Cumuluszellen getrennt. Diese Trennung kann mechanisch erreicht werden, indem die Oozyten mehrmals durch einen engen Pipette aufgezogen werden (Fulka und Okolski 1981). Auch die vorherige Behandlung der COCs mit Hyaluronidase ist beschrieben (Choi et al. 1993; Hinrichs et al. 1993), sowie die Verwendung von 3 % Natriumzitrat (Alm und Torner 1994). HINRICHS und Mitarbeiter beschreiben auch eine zunächst mechanische Entfernung der meisten Cumuluszellen mit nachfolgender Entfernung der Corona radiata durch das Pipettieren der Oozyten in 0,25 % Trypsin-Lösung in Hank's Salzlösung ohne  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  oder  $\text{MgSO}_4$  (Hinrichs et al. 1993). Nach der Entfernung der Cumuluszellen werden die Oozyten 24 h in Ethanolazetat (3:1) (Fulka und Okolski 1981; Zhang et al. 1989; Choi et al. 1993) fixiert und gefärbt. Zur Färbung kann 1 % Orzein (Fulka und Okolski 1981; Choi et al. 1993; Okolski et al. 1993) oder 1 % Lacmoid (Zhang et al. 1989; Dell'Aquila et al. 1995) verwendet werden. Das Meiosestadium wird dann mit einem Phasenkontrastmikroskop untersucht.

Eine andere Möglichkeit zur Untersuchung der Kernreifung besteht in der Verwendung eines Fluoreszenz-Mikroskopes (Hinrichs et al. 1993; Guignot et al. 1999). Hierzu werden die Oozyten für 24 h in einer gepufferten Formalinlösung (Hinrichs et al. 1993) oder für 1 h in 2,5 % Glutaraldehyd-Lösung mit 0,1 M Natriumcacodylat-Puffer (Guignot et al. 1999; Bogh et al. 2002) fixiert. Anschließend werden sie auf einen Objektträger in einen Tropfen Medium gegeben, welches aus 3:1 Glycerin-Phosphat gepufferter Salzlösung und 2,5 µg/ml Hoechst 33258 besteht (Hinrichs et al. 1993; Choi et al. 2002; Love et al. 2002). Andere Untersucher verwenden 0,2 bzw. 1 µg/ml Hoechst 33342 Färbung (Guignot et al. 1999; Bogh et al. 2002). Durch die Inkubation mit einem DNA spezifischen Farbstoff kann mit dem Fluoreszenz-Mikroskop das Chromatin in allen Stadien der Oozytenreifung sichtbar gemacht werden. Die Methode wird von den Untersuchern gerade bei Stutenoozyten als vorteilhaft betrachtet, da es nicht notwendig ist, vorher die in hohem Anteil vorhandenen Lipide zu entfernen. Die Anzahl nicht analysierbarer Oozyten ist wesentlich niedriger (6,6 %) als bei der Behandlung mit Ethanolazetat und Färbung mit Lacmoid (18 % (Zhang et al. 1989)) oder Orzein (37 % (Desjardins et al. 1985)). Die

Chromatinkonfiguration kann eingeteilt werden in: fluoreszierender Nukleus, kondensiertes Chromatin, Diakinese, Metaphase I, Metaphase II, degeneriert oder nicht analysierbar (Hinrichs et al. 1993).

### 10.2.2 Beurteilung der zytoplasmatischen Reifung

Durch die elektronenmikroskopische Untersuchung von Oozyten nach 10, 20 und 30 stündiger Reifung *in vitro* konnten Erkenntnisse über die zytoplasmatische Reifung von Stutenoozyten gewonnen werden (Neumann et al. 1996). Die Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Verteilung der Zellorganellen bei Oozyten, welche sich nach zehn stündiger *in vitro*-Reifung noch im Keimbläschenstadium befinden, derjenigen immaturer Oozyten entspricht. Dabei zeigte der exzentrisch gelegene Nukleus eine leicht undulierende Membran und einen kompakten Nukleolus, dessen Erscheinung mit dem Vorhandensein von kondensiertem Chromatin in Verbindung gebracht wird. Der Perivitellinspalt war klein. Membrangebundene Vesikel des glatten endoplasmatischen Retikulums waren die vorherrschenden Strukturen. Die Mitochondrien wurden in kleinen Nestern über das gesamte Ooplasma verstreut gefunden, die höchste Konzentration fand man jedoch in der peripheren Zone nahe des Oolemm. Einzelne Lipidtropfen oder kleine Anhäufungen waren im Ooplasma verstreut. Eine begrenzte Anzahl kortikaler Granula konnte im peripheren Ooplasma und auch paranukleär festgestellt werden, teilweise in kleinen Nestern. Die Wiederaufnahme der Meiose begann bei den Oozyten nach 20 stündiger Reifung und war bei den Oozyten nach 30 stündiger Reifung weiter fortgeschritten. Der zytoplasmatische Reifungsprozeß war durch folgende Vorgänge charakterisiert:

- Vergrößerung des Perivitellinspaltes,
- Wanderung der Mitochondrien in eine zentrale Lage,
- Wanderung der kortikalen Granula zum Oolemm,
- Bildung von Mikrovilli auf der Zelloberfläche,
- die Tubuli des glatten endoplasmatischen Retikulums bilden große Komplexe und werden von Mitochondrien umgeben,
- große, membrangebundene Vesikel des glatten endoplasmatischen Retikulums dominieren das Zytoplasma und
- nur wenige Lipidtröpfchen befinden sich im Ooplasma zerstreut (Neumann et al. 1996).

Diese Veränderungen bei *in vitro* gereiften Oozyten stimmen mit den Ergebnissen aus Untersuchungen von *in vivo* gereiften Oozyten überein (Grondahl et al. 1995).

### 10.2.3 Beurteilung der Cumuluszellexpansion

Die Beurteilung der Cumuluszellexpansion erfolgt ohne vorherige Färbung unter einem Stereomikroskop und wird ebenfalls zur Beurteilung der Oozytenreifung herangezogen (Zhang et al. 1989; Willis et al. 1991; Dell'Aquila et al. 1995; Bogh et al. 2002). Dabei stellte sich jedoch heraus, daß bei der *in vitro*-Kultur von Oozyten der Grad der Cumuluszellexpansion nicht notwendigerweise mit dem Grad der Kernreifung übereinstimmt. So zeigten Oozyten nach Reifung zur Metaphase II nur teilweise expandierte Cumuli (Zhang et al. 1989). Andererseits konnte man auch feststellen, daß *in vivo* und *in vitro* gereifte Oozyten mit expandierten Cumuli sich nicht notwendigerweise in der Metaphase II befinden (Bezard et al. 1997; Goudet et al. 1997). Einige Untersucher vermuten, daß die Cumuluszellexpansion der Kernreifung vorausgeht (Bezard et al. 1997), oder daß die Cumuluszellexpansion unabhängig von der Kernreifung vor sich geht (Bogh et al. 2002). Die Synchronität zwischen der Cumuluszellexpansion und der Kernreifung scheint für die nachfolgende *in vitro*-Befruchtung jedoch von Bedeutung zu sein (Goudet et al. 1998).

## 10.3 Reifungsmedien

Die bisher zur Kultur verwendeten Medien sind:

- Krebs Ringer Bicarbonat (Desjardins et al. 1985),
- Defined Medium (DM) (Willis et al. 1991),
- Menezo's B2 Medium (Willis et al. 1991),
- Ham's F10 (Shabpareh et al. 1992; Shabpareh et al. 1993),
- Follikelflüssigkeit (Hinrichs et al. 1992; Bogh et al. 2002; Hinrichs et al. 2002),
- Tissue Culture Medium 199 (TCM 199) (Zhang et al. 1989; Choi et al. 1993; Landim-Alvarenga et al. 2002) und
- Equine Maturation Medium (EMM) (Franz et al. 2002; Galli et al. 2002; Landim-Alvarenga et al. 2002).



Krebs Ringer Bicarbonat wurde in einer der ersten Untersuchungen zur Reifung von Stutenoozyten verwendet; 62,1 % der Oozyten nahmen die Meiose wieder auf (Desjardins et al. 1985). Das von den meisten Untersuchern verwendete Medium ist TCM 199. Eine vergleichende Studie zwischen TCM 199, Menezo's B2 und DM mit jeweils drei bzw. vier unterschiedlichen Serumzusätzen ergab, daß weniger die Art des Mediums als vielmehr die Art des Serumzusatzes die Oozytenreifung beeinflusst (Willis et al. 1991). OKOLSKI und Mitarbeiter erhielten bei der Oozytenreifung in B2 Medium eine unbedeutend höhere Anzahl an Oozyten in Metaphase II als bei der Reifung in TCM 199 (Okolski et al. 1991). Bei anderen Untersuchungen stellte man beim Vergleich von TCM 199 und Ham's F10 fest, daß sich zwar beide Medien zur Reifung von Oozyten eignen, die Oozyten in Ham's F10 jedoch zur Reifung eine längere Zeit benötigen (48 h gegenüber 36 h) (Shabpareh et al. 1992; Shabpareh et al. 1993). TCM 199 und EMM eignen sich gleich gut zur Reifung von Oozyten. Während GALLI und Mitarbeiter bei der Reifung in EMM eine bessere Cumuluszellexpansion feststellten (Galli et al. 2002), konnte dies von anderen Untersuchern nicht bestätigt werden (Landim-Alvarenga et al. 2002). Letztere stellten dagegen in den Oozyten mehr intakte Zellorganellen nach Reifung in EMM als in TCM 199 fest.

BOGH und Mitarbeiter (Bogh et al. 2002) führten die Oozytenreifung in 100 % Follikelflüssigkeit durch. Die präovulatorische Follikelflüssigkeit wurde von sechs Stuten während der Monate März bis Mai gewonnen. Der Zyklusstand der Stuten wurde regelmäßig mit Ultraschall untersucht. Zeigte der größte Follikel einen Durchmesser von  $\geq 32$  mm wurde entweder die transvaginale Follikelpunktion durchgeführt (t = 0 h) oder die Stuten erhielten 25 mg Hypophysenextrakt (CEG) i.m. und die Follikelpunktion wurde 35 h später durchgeführt (t = 35 h). Die Follikelflüssigkeit wurde gesammelt und nach COCs durchsucht. Die Proben wurden dann zentrifugiert und der Überstand bei  $-18^{\circ}\text{C}$  eingefroren (Bogh et al. 2002). Bei der Stute ändert sich die Zusammensetzung der Follikelflüssigkeit mit dem Stadium der Follikelentwicklung. Während das Verhältnis von Östradiol 17 $\beta$  zu Progesteron mit dem Follikeldurchmesser zunimmt und am Ende der Follikelphase höher ist als im Diöstrus (Goudet et al. 1998), scheinen die Aspartat-Aminotransferase, das Gesamteiweiß, Glukose, Kalium, Kalzium und Magnesium mit steigender Follikelreifung abzunehmen (Collins et al. 1997). Kürzlich wurde ein 200 kDa Protein in der präovulatorischen Follikelflüssigkeit von Stuten isoliert, dessen Präsenz durch eine einzelne Injektion equinen Hypophysenextraktes induziert werden kann (Gerard et al. 1998). Desweiteren wurden in der präovulatorischen Follikelflüssigkeit von Frauen zwei Meiose aktivierende Steroide (MAS) gefunden (Byskov et al. 1995; Baltzen und Byskov 1999), welche die Wiederaufnahme der

Meiose bei Meiose gehemmten Mauseoozyten induzieren können (Byskov et al. 1995). Es wird vermutet, daß die Cumuluszellen als Reaktion auf den präovulatorischen FSH Anstieg MAS produzieren, welche in die Oozyte übertragen werden und dort als Meiose aktivierende Hormone wirken (Andersen et al. 1999). Beide MAS-Typen konnten nun auch aus der Follikelflüssigkeit von Stuten isoliert werden, wobei die MAS-Konzentration mit der Follikelreifung ansteigt und in dominanten Follikeln, verglichen mit untergeordneten Follikeln, deutlich höher ist (Brück et al. 2000; Baltsen et al. 2001). Deshalb vermutet man, daß MAS in der Wiederaufnahme der Meiose bei Stutenoozyten eine Rolle spielt.

Die Einzelproben der präovulatorischen Follikelflüssigkeit wurden für die Medien wie folgt ausgewählt: FF1 = Gewinnung Zeitpunkt 0 h, Keimbläschen vorhanden, niedrige MAS-Konzentration (<110 ng/ml); FF2 = Gewinnung Zeitpunkt 0 h, Keimbläschen vorhanden, hohe MAS-Konzentration (>200 ng/ml); FF3 = Gewinnung Zeitpunkt 35 h nach CEG, Metaphase II vorhanden, niedrige MAS-Konzentration (<110 ng/ml). Es wurde jeweils Follikelflüssigkeit von zwei Stuten verwendet. Die genauen MAS- und Progesteronkonzentrationen im Reifungsmedium sind in Tabelle 22 aufgeführt. Als Kontrollmedium wurde TCM 199 verwendet.

**Tabelle 22:** MAS- und Progesteronkonzentrationen und Nachweis des 200 kDa Proteins in den Reifungsmedien (modifiziert nach Bogh (Bogh et al. 2002))

Medium	gesamt MAS (ng/ml)	Progesteron (ng/ml)	200 kDa Protein
<b>FF1</b>	77	36	-
<b>FF2</b>	124	45	-
<b>FF3</b>	98	250	++
<b>TCM 199</b>	n.d. <sup>a</sup>	n.d. <sup>b</sup>	n.a.

Das Vorhandensein des 200 kDa Proteins wurde subjektiv über das SDS-Gel festgesetzt - = nicht sichtbar, ++ = deutliche Bande; n.a. = nicht analysiert; n.d. = unter der Nachweisgrenze; <sup>a</sup> < 1 ng/ml; <sup>b</sup> < 1,5 ng/ml

MAS = Meiose aktivierende Steroide

Nach 30 Stunden Kultur wurde die Cumuluszellexpansion und die Kernreifung der Oozyten beurteilt. Dabei zeigte sich, daß die Cumuluszellexpansion in FF3 und Kontrollmedium besser war als in FF1 und FF2 (93 – 100 % gegenüber 7 – 58 %), auch die Kernreifung war in diesen Medien tendenziell besser. Alle in FF3 und TCM 199 gereiften Oozyten, welche die Metaphase II erreichten, waren von einem expandierten Cumulus umgeben, während nach Kultur in FF1 80 % der Metaphase II Oozyten einen kompakten Cumulus zeigten. Somit

scheint in FF3 und dem Kontrollmedium eine bessere Synchronität zwischen Kernreifung und Cumuluszellexpansion gegeben zu sein. Die Ergebnisse lassen zudem vermuten, daß die Regulation der wieder eintretenden Meiose während der Kultur nicht von hohen MAS-Konzentrationen, sondern vom Vorhandensein des 200 kDa Proteins beeinflusst wird. Insgesamt läßt sich somit sagen, daß die Verwendung von Follikelflüssigkeit zur Oozytenreifung *in vitro* eine brauchbare Alternative zu den kommerziell erhältlichen Kulturmedien darstellt (Bogh et al. 2002). Dies wird durch die Ergebnisse einer Untersuchung zur *in vitro*-Fertilisation unterstützt. Dabei zeigten Oozyten, die in 100 % Follikelflüssigkeit gereift wurden, eine deutlich höhere Befruchtungsrate (13 bis 24 %) als Oozyten, die in Kulturmedium oder 20 % Follikelflüssigkeit reiften (0 bis 12 %) (Hinrichs et al. 2002).

#### 10.4 Zugesezte Serumkomponenten

Folgende Serumkomponenten wurden in unterschiedlichen Anteilen den Reifungsmedien zugesetzt:

- fetales Kälberserum (FCS) (Zhang et al. 1989; Choi et al. 1993; Bogh et al. 2002),
- Stutenserum (gewonnen später Östrus (Zhang et al. 1989) / erster Tag des Östrus (MS) / Tag der Ovulation (MSO) (Willis et al. 1991) / Östrus (Shabpareh et al. 1993)),
- Kuhserum (gewonnen Tag der Ovulation (Brück et al. 1995; Dell'Aquila et al. 1995)) und
- bovines Serumalbumin (BSA) (Carneiro et al. 2001; Galli et al. 2002; Landim-Alvarenga et al. 2002).

Bei einer vergleichenden Studie wurden Oozyten entweder in TCM 199 mit 20 % Stutenserum vom späten Östrus oder mit 10 % FCS plus Gonadotropine (2,5 µg/ml FSH, 2,5 µg/ml LH und 0,02 µg/ml Prolactin) gereift (Zhang et al. 1989). Während es im Bezug auf die Kernreifung zwischen den beiden Medien keinen Unterschied gab (63 % bzw. 64 % Metaphase II im Medium mit Stutenserum bzw. FCS plus Gonadotropine nach 30 h), zeigten die Oozyten in TCM 199 mit Stutenserum eine deutlich geringere Cumuluszellexpansion (13 % gegenüber 89 %). Die Autoren vermuten, daß die Cumuluszellexpansion bei Verwendung von Stutenserum wegen einer zu geringen Konzentration an FSH nicht ablaufen kann. Ein Zusammenhang zwischen Cumuluszellexpansion und FSH konnte auch bei Schafen aufgezeigt werden (Moor et al. 1981). Die FSH-Konzentration im Serum von Stuten im

späten Östrus liegt bei 0,1 bis 0,5 µg/ml (Snyder et al. 1979; Urwin und Allen 1982). Dies ist deutlich weniger als die verwendeten Konzentrationen bei FSH-Zusatz (2,5 µg/ml).

WILLIS und Mitarbeiter verglichen die Oozytenreifung in verschiedenen Medium / Serum Kombinationen (Willis et al. 1991). Als Medien wurden verwendet: a) Menezoe's B2 oder b) TCM 199 oder c) Defined Medium (DM) jeweils in Kombination mit 1) 15 % FCS oder 2) am ersten Tag des Östrus gewonnenes Stutenserum (MS) oder 3) am Tag der Ovulation gewonnenes Stutenserum (MSO) und als Kontrollmedium DM plus 3 g/l BSA. Die Reifungszeit betrug 32 h. Der Serumtyp hatte einen deutlichen Einfluß auf die Reifungsrate. Sowohl FCS als auch MS und MSO erhöhten den Anteil an Metaphase II Oozyten gegenüber BSA; zwischen FCS, MS und MSO zeigte sich jedoch kein deutlicher Unterschied, was die Untersuchungen von ZHANG und Mitarbeitern (Zhang et al. 1989) unterstützt. Die höchste Cumuluszellexpansion (100 %) zeigte sich nach Reifung in allen Medien + FCS. Der Zusatz von MS oder MSO zu den Medien ergab eine Cumulusexpansion von 80 %, während sie bei der Kontrollgruppe bei nur 50 % lag.

Beim Vergleich von im Östrus gewonnenem Stutenserum mit Kuhserum (je 20 % in TCM 199) konnte weder ein Unterschied in der Kernreifung (82 bzw. 87,5 % M II) noch in der Cumuluszellexpansion (87 bzw. 91 %) festgestellt werden (Dell'Aquila et al. 1995). Das Stutenserum wurde am Tag vor der Ovulation gewonnen.

## 10.5 Zugesezte Hormone

Folgende Hormone wurden in unterschiedlicher Kombination und Dosierung den Kulturmedien zugesetzt:

- bovines / equines / ovines LH (Willis et al. 1991; Dell'Aquila et al. 1995; Landim-Alvarenga et al. 2002),
- bovines / equines / ovines FSH (Zhang et al. 1989; Willis et al. 1991; Bezard et al. 1997; Landim-Alvarenga et al. 2002),
- eCG (Willis et al. 1991; Willis et al. 1991),
- Prolactin (Zhang et al. 1989)
- Progesteron (Galli et al. 2002) und
- Östradiol 17β (DelCampo et al. 1992; Galli et al. 2002).

In den meisten zur Oozytenreifung verwendeten Medien werden LH, FSH und Östradiol zugesetzt. Die Zusätze erscheinen sinnvoll, da diese Hormone auch zum Zeitpunkt der Oozytenreifung *in vivo* präsent sind (Squires 1996). Equine Gonadotropine sind zur Oozytenkernreifung und Erreichung der Cumuluszellexpansion besser geeignet als ovine Gonadotropine (Bezard und Palmer 1992).

WILLIS und Mitarbeiter testeten den Zusatz von bovinem und equinem LH, bovinem FSH und eCG zu TCM 199 + 15 % MSO (Willis et al. 1991; Willis et al. 1991). Dabei wurde das equine LH, das bovine FSH und das eCG vor der Verwendung eingefroren, das bovine LH wurde entweder ebenfalls vor der Verwendung eingefroren oder frisch verwendet. Als Kontrolle diente TCM 199 plus 15 % MSO ohne Hormonzusatz. Die Zugabe von zuvor tiefgefrorenem bovinen (1/ 10/ 100 µg/ml) oder equinem LH (100 µg/ml) hatte keinen deutlichen Effekt auf die Anzahl an Oozyten in Metaphase II und die Cumuluszellexpansion nach 15 h Kultur. Dagegen führte die Zugabe von frischem bovinen LH (1/ 10/ 100 µg/ml) zu einer deutlichen Hemmung der Oozytenkernreifung. Die Zugabe von zuvor gefrorenem LH (100 µg/ml) plus FSH (5 µg/ml) zum Medium führte nach 15 h Kultur zu einer 100 %igen Cumuluszellexpansion. Eine deutliche Steigerung an Oozyten in Metaphase II konnte nach 32 h Kultur bei Zugabe von eCG (100 IU/ml) erreicht werden (62 % gegenüber 52 %). Eine 100 % Cumuluszellexpansion war dabei schon nach 15 h erreicht (Willis et al. 1991). Während die Untersucher einmal eine erhöhte Oozytendegeneration bei eCG Zugabe feststellen mussten (Willis et al. 1991), konnte dies in einem weiteren Versuch nicht bestätigt werden (Willis et al. 1991). Im Gegensatz dazu konnten SHABPAREH und Mitarbeiter durch den Zusatz von 100 IU/ml eCG zu TCM 199 keinen Einfluß auf die Kernreifung oder die Cumuluszellexpansion nach 30 h Kultur verglichen mit einer Kontrollgruppe feststellen (Shabpareh et al. 1993).

## 10.6 Zusatz somatischer Zellen

Folgende Zellen wurden in unterschiedlicher Kombination den Kulturmedien zugesetzt:

- Granulosazellen (Hinrichs et al. 1992; Okolski et al. 1993; Alm und Torner 1994),
- Theca interna Zellen (Hinrichs et al. 1992; Okolski et al. 1993; Choi et al. 2002),
- Eileiter- Epithelzellen (Li et al. 2001) und
- fetale Fibroblastzellen (Li et al. 2001).

Die Zugabe von Granulosazellen und Zellen der Theca interna von Stuten soll einen positiven Effekt auf die Oozytenkernreifung und die Cumuluszellexpansion haben (Okolski et al. 1993; Alm und Torner 1994). OKOLSKI und Mitarbeiter testeten die Zugabe von Granulosazellen ( $3 \times 10^6$  /ml), Theca interna Zellen ( $0,3 \times 10^6$  /ml) oder beider Zelltypen gemeinsam zu TCM 199. Die Cumuluszellexpansion bei Zusatz von Granulosazellen lag nach 36 h bei 80 % gegenüber 39 % bei der Kontrollgruppe. Die Zugabe von Theca interna Zellen beeinflusste die Anzahl an Oozyten in Metaphase II insofern, als sich eine Tendenz zur Erhöhung der Metaphase II Oozyten zeigte. Nach 36 h Kultur wurde die Cumuluszellexpansion der Oozyten deutlich positiv beeinflusst (96 %). Die Interpretation dieser Ergebnisse ist jedoch schwierig. Dem Kulturmedium war auch FSH, LH und Östradiol zugesetzt und Theca interna Zellen können durch den Einfluß von LH Androstendion synthetisieren, welches durch die Granulosazellen zu Östradiol aromatisiert werden kann. Nach der Vermutung von SIROTKIN inhibiert Östradiol die Oozytenreifung (Sirotkin 1992). Dies würde die Ergebnisse der Kultur mit einer Kombination aus Theca interna und Granulosazellen erklären. Im Gegensatz zur Reifung mit Theca interna Zellen alleine war dabei die Stimulation der Cumuluszellexpansion weniger deutlich. Andere Wissenschaftler vermuten jedoch, daß initial hohe Östrogenwerte zur zytoplasmatischen Reifung notwendig sind (Moor und Trounson 1977). Es ist bisher jedoch nicht gesichert, ob das zur Kultur zugesetzte Östrogen oder die Interaktion zwischen Theca interna und Granulosazellen die Reifung der Oozyten *in vitro* beeinflusst.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von OKOLSKI und ALM konnte in einem weiteren Versuch der positive Effekt der Theca interna Zellen auf die Oozytenreifung nicht bestätigt werden (Choi et al. 2002). So waren nach 42 h Kultur in TCM 199 + Theca interna Zellen genauso viele Oozyten in Metaphase II als nach Kultur im TCM 199 Kontrollmedium (29 % gegenüber 30 %).

Zur Gewinnung der Granulosa- und Theca interna Zellen wurden Follikel mit einem Durchmesser von 25-30 mm eröffnet und mit einer gebogenen Pinzette vorsichtig ausgeschabt. Die Granulosazellen wurden in TCM 199 überführt und dann durch die Passage einer Pasteur Pipette voneinander getrennt. Danach erfolgte eine zweimalige Zentrifugation bei 200G für jeweils zehn Minuten. Der Überstand wird verworfen und der Bodensatz in TCM 199 resuspendiert (Channing 1966; Okolski et al. 1993). Nach der Entfernung der Granulosazellen kann die Theca interna Schicht von der darunter liegenden vaskulären Theca externa manuell getrennt werden und in eine Petrischale mit TCM 199 überführt werden. Das Gewebe wurde in kleine Stücke zerschnitten und mehrmals mit einer Pipette zur Trennung der Zellen aspiriert. Das Medium wurde mehrmals gewechselt, bis keine Granulosazellhaufen

mehr unter dem Mikroskop gefunden werden konnten. Nach dreimaliger Inkubation in PBS + 0,25 % Trypsin für 15 min. wurde die Zellsuspension zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Bodensatz in TCM 199 resuspendiert (Stoklosowa et al. 1978; Okolski et al. 1993).

Der Zusatz von Eileiterepithelzellen oder fetalen Fibroblasten zum Kulturmedium (TCM 199) wurde von LI und Mitarbeitern getestet (Li et al. 2001). Nach der *in vitro*-Reifung wurde bei den Oozyten die intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) durchgeführt. Dabei konnten gegenüber einer Kontrollgruppe deutlich mehr Blastozysten aus denjenigen Oozyten gewonnen werden, welche zuvor mit einem der beiden Zelltypen reiften. Dies deutet darauf hin, daß sich sowohl Eileiterepithelzellen als auch fetale Fibroblasten zur Unterstützung der Oozytenreifung *in vitro* eignen.

## 10.7 Sonstige zugesetzte Komponenten

- Earle's Salts (Hinrichs et al. 1993; DelCampo et al. 1995; Dell'Aquila et al. 1995)
- HEPES-Puffer (Dell'Aquila et al. 1995)
- Natriumbicarbonat (Zhang et al. 1989; Hinrichs et al. 1993; Brück et al. 1995)
- Polyvinylalkohol (Zhang et al. 1989)
- Glutamin (Zhang et al. 1989; Hinrichs et al. 1993; Guignot et al. 1999)
- Pyruvat / Natriumpyruvat (DelCampo et al. 1992; Shabpareh et al. 1992; Okolski et al. 1993)
- Kalzium-Laktat (Brück et al. 1995; Dell'Aquila et al. 1995) / Natrium-Laktat (Galli et al. 2002)
- Cystein (Galli et al. 2002; Landim-Alvarenga et al. 2002)
- Cysteamin (Galli et al. 2002; Landim-Alvarenga et al. 2002)
- Taurin (Galli et al. 2002; Landim-Alvarenga et al. 2002)
- L-Ascorbinsäure (Zhang et al. 1989; Okolski et al. 1993)
- Insulin (Zhang et al. 1989; Okolski et al. 1993)
- Insulin, Transferrin, Natriumselenit (ITS) (Galli et al. 2002)
- Gentamycin (Hinrichs et al. 1993; Brück et al. 1995; Dell'Aquila et al. 1995)
- Penicillin / Streptomycin (Alm und Torner 1994; Guignot et al. 1999; Bogh et al. 2002)
- Kanamycinsulfat (Zhang et al. 1989)

- Amphotericin B (Fungizone®) (Hinrichs et al. 1993; Brück et al. 1995; Guignot et al. 1999; Bogh et al. 2002)
- Insulin-like growth factor I (IGF-I) (Carneiro et al. 2001; Galli et al. 2002; Landim-Alvarenga et al. 2002)
- Epidermal growth factor (EGF) (Galli et al. 2002; Landim-Alvarenga et al. 2002)

Viele der hier genannten Zusätze sind in den Standardkulturmedien bereits vorhanden und wurden im Bezug auf die Reifung der Pferdeoozyten nicht speziell näher untersucht.

Die Angaben für die Konzentrationen der hier genannten Antibiotika sind:

- Gentamycin: 25 µg/ml (Hinrichs et al. 1993), 50 µg/ml (Brück et al. 1995; Dell'Aquila et al. 1995)
- Penicillin: 100 IU/ml / Streptomycin: 100 µg/ml (Alm und Torner 1994; Guignot et al. 1999; Bogh et al. 2002)
- Kanamycinsulfat: 75 µg/ml (Zhang et al. 1989)
- Amphotericin B: 0,25 µg/ml (Guignot et al. 1999; Bogh et al. 2002), 1,25 µg/ml (Hinrichs et al. 1993), 2,5 µg/ml (Brück et al. 1995)

Spezielle Untersuchungen im Bezug auf die Reifung von Pferdeoozyten gab es für den Insulin-like growth factor I (IGF-I) und für den Epidermal growth factor (EGF). Der Effekt von IGF-I und seine Wechselwirkung mit Gonadotropinen, Östradiol und FCS bei der *in vitro*- Reifung wurde von CARNEIRO und Mitarbeitern getestet (Carneiro et al. 2001). In einem ersten Versuch wurden kompakte Oozyten in TCM 199 mit BSA, Antibiotika und IGF-I in einer Konzentration von 0 (Kontrolle), 50, 100 und 200 ng/ml bei 39°C für 36 oder 48 h kultiviert. Es stellte sich heraus, daß IGF-I die Oozytenreifung konzentrationsabhängig stimuliert. Die höchste Reifungsrate erhielten die Untersucher mit 200 ng/ml IGF-I. Mit dieser Dosierung wurde dann in einem zweiten Versuch weiter gearbeitet. Zusätzlich wurden dem TCM 199 Medium noch FSH, LH, Östradiol und FCS zugegeben. Hierbei konnte jedoch kein Effekt auf die Oozytenreifung beobachtet werden. In einem letzten Versuch wurde nun bei Oozyten aller Versuchsgruppen (IGF-I; Hormone; IGF-I + Hormone) die Parthenogenese durch Kalziumionophor mit anschließender Kultur in 6-DMAP (6-Dimethylaminopurin) stimuliert. Signifikante Unterschiede bezüglich der Teilungsrate konnten zwischen der Gruppe IGF-I + Hormone, IGF-I und Hormone beobachtet werden (45,4 %, 27,8 %, 12,9 %). Die Ergebnisse zeigen, daß IGF-I einen positiven Effekt auf die Kernreifungsrate der Pferdeoozyten hatte. Die Kombination von IGF-I mit Hormonen und FCS hatte keinen



Einfluß auf die Kernreifung. Durch die Teilungsrate nach Induktion der Parthenogenese läßt sich jedoch ein positiver Effekt auf die zytoplasmatische Reifung erkennen.

Bei der Reifung von Rinderoozyten konnte ein deutlicher Anstieg der Kernreifungsrate bei Zusatz von 15 ng/ml Epidermal growth factor (EGF) zum Kulturmedium festgestellt werden (Im und Park 1995). Der Einfluß von EGF auf die Reifung von Pferdeoozyten wurde in drei Medien getestet: TCM 199 (Kontrolle), TCM 199 + 10 ng/ml IGF-I + 50 ng/ml EGF und EMMI + 10 ng/ml IGF-I + 50 ng/ml EGF (Landim-Alvarenga et al. 2002). Als Serumzusatz wurde BSA verwendet. Nach 36 bis 40 h Reifung bei 39°C konnte zwischen den drei Versuchsgruppen kein Unterschied in der Cumuluszellexpansion oder der Kernreifung festgestellt werden. GALLI und Mitarbeiter benutzten ebenfalls drei unterschiedliche Medien: TCM 199 + 50 ng/ml EGF + 100 ng/ml IGF-I mit 10 % FCS, TCM 199 mit 10 % Serumersatz und EMMI + 10 ng/ml IGF-I + 100 ng/ml EGF mit 8 mg/ml BSA. Nach 28 h Reifung wurde die ICSI durchgeführt. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der Kernreifung, Teilung und Entwicklungsrate zwischen den verschiedenen Reifungsmedien festgestellt.

## 10.8 Kulturbedingungen

Die zur *in vitro*-Reifung vorgesehenen Oozyten werden meist zuerst in dem verwendeten Basismedium gewaschen (Shabpareh et al. 1993; Brinsko et al. 1995) und dann entweder einzeln oder in Gruppen in das Kulturmedium eingebracht. Über die Menge des verwendeten Kulturmediums gibt es verschiedene Angaben. Diese variieren bei einzeln kultivierten Oozyten zwischen 10 µl (DelCampo et al. 1992; Choi et al. 2002; Love et al. 2002), 20 µl (Brück et al. 1995), 100 µl (Shabpareh et al. 1993) und 500 µl (Bezard et al. 1997), bei in Gruppen kultivierten Oozyten zwischen 100 µl / 5-10 Oozyten (Shabpareh et al. 1993), 400 µl / 10-20 Oozyten (Dell'Aquila et al. 1995) und 500 µl / 6-20 Oozyten (Guignot et al. 1999). Bei der *in vitro*-Reifung von Rinderoozyten konnte man feststellen, daß die *in vitro*-Kultur von Oozyten in Gruppen sowohl die Reifung als auch die Embryonalentwicklung verbessert (Sirard et al. 1988). Das Kulturmedium kann mit Paraffinöl (Fulka und Okolski 1981; DelCampo et al. 1992; Shabpareh et al. 1993) oder Silikonöl (Brinsko et al. 1995) bedeckt werden. Nach einstündiger Equilibration in wasserdampfgesättigter, 5 %iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre können die Oozyten, welche unter gleichen Bedingungen reifen, eingesetzt werden (Fulka und Okolski 1981; Dell'Aquila et al. 1995; Landim-Alvarenga et al. 2002).

Die angegebene Temperatur zur Reifung der Pferdeoocyten reicht von 37,5°C (Fulka und Okolski 1981; Zhang et al. 1989) bis 39,0°C (Willis et al. 1991; DelCampo et al. 1992; Shabpareh et al. 1992). Dazwischen werden auch Werte von 38,0°C (Hinrichs et al. 1993), 38,2°C (Choi et al. 2002; Love et al. 2002) und 38,5°C (Choi et al. 1993; Okolski et al. 1993; Alm und Torner 1994) genannt.

Abgesehen von der *in vitro*-Reifung ist auch die *in vivo*-Reifung immaturer Oocyten in einer Empfängerstute möglich (Goudet et al. 1997). Dabei werden die gewonnenen Oocyten unter Ultraschallkontrolle in den präovulatorischen Follikel einer Empfängerstute übertragen, welche mit equinem Hypophysenextrakt zur Auslösung der Ovulation behandelt wurde. Kurz vor der Ovulation (34 h nach der Behandlung mit Hypophysenextrakt) wird der Follikel erneut punktiert, um sowohl die übertragene als auch die ursprünglich vorhandene Oozyte zu gewinnen. Die Unterscheidung der beiden Oocyten ist möglich, da die ursprünglich vorhandene Oozyte einen weiter expandierten Cumulus zeigt, welcher durch eine hohe Konzentration an Hyaluronsäure gelblich gefärbt ist. Die übertragenen Oocyten zeigten eine Reifungsrate von 32 %.

## 10.9 Kulturzeit

Eine Reihe von Studien zur *in vitro*-Reifung von Pferdeoocyten haben die benötigte Zeit zur Erreichung der Metaphase II (vollständige Reifung) untersucht. Zum Zeitpunkt 0 (= Zeitpunkt der Gewinnung der Oozyte aus dem Follikel) befinden sich 65 bis 70 % der Oocyten im Keimbläschenstadium oder an dessen Ende (germinal vesicle breakdown). Insgesamt kann man sagen, daß nach 30 h Kultur in TCM 199 bei 39°C mit 5 % CO<sub>2</sub> ungefähr 50 bis 80 % der Oocyten Metaphase II erreicht haben (Squires 1996).

In einer der ersten Untersuchungen zur Reifung von Pferdeoocyten wurde bei einer Kulturzeit von 20 bis 24 h eine Reifungsrate von 70,5 % (Metaphase I) angegeben und nach 40 h 68,2 % (Metaphase II). Dabei wurden nur Oocyten mit kompaktem Cumulus verwendet (Fulka und Okolski 1981). Bei einer vergleichenden Reifung von Oocyten mit kompaktem oder teilweise expandiertem Cumulus konnte man feststellen, daß die Anzahl der Oocyten in Metaphase II bei kompaktem Cumulus ein Maximum nach 30 h Kultur erreichte (61 %), während das Maximum für Oocyten mit teilweise expandiertem Cumulus schon nach 24 h Kultur erreicht war (68 %) (Zhang et al. 1989). Diese Ergebnisse konnten von anderen Untersuchern bestätigt werden (Hinrichs et al. 1993). Dabei wurde das Maximum für

Oozyten mit expandiertem Cumulus ebenfalls nach 24 h erreicht (63 %), für Oozyten mit kompaktem Cumulus nach 32 h Kultur (72 %). CHOI und Mitarbeiter geben für Oozyten mit expandiertem Cumulus eine deutlich höhere Reifungsrate an als für Oozyten mit kompaktem (64 % gegenüber 25-30 %) (Choi et al. 2002). Dabei wurden Oozyten mit expandiertem Cumulus 24 h, Oozyten mit kompaktem Cumulus 24 und 42 h gereift.

Die Wiederaufnahme der Meiose wurde bei den meisten Oozyten (kompakter Cumulus) zwischen 8 h und 16 h Kultur beobachtet. Dabei erhöhte sich die Anzahl der Oozyten in Metaphase II deutlich zwischen 16 h und 24 h und zwischen 24 h und 32 h (Choi et al. 1993). WILLIS und Mitarbeiter berichten von wesentlich kürzeren Reifungszeiten für Oozyten mit kompaktem Cumulus (Willis et al. 1991; Willis et al. 1991). Schon nach 15 h Kultur war ein deutlicher Anstieg der Oozyten in Metaphase II erreicht, die Kultur für 32 h konnte die Reifung der Oozyten nicht mehr verbessern.

#### **10.10 Faktoren, welche die Oozytenreifung *in vitro* beeinflussen**

DEL CAMPO und Mitarbeiter untersuchten in einer Studie, ob die Oozytenreifung *in vitro* von Eigenschaften der Stute, des Ovars, des Follikels oder der Oozyte beeinflusst wird (DelCampo et al. 1992). Dabei zeigte sich, daß 1.) die Ovarien von nicht-trächtigen Stuten stammen sollten, welche sich nicht in der Lutealphase befinden, 2.) die Wand der Follikel wenig vaskularisiert sein sollte, und 3.) Oozyten mit heterogenem oder fragmentiertem Ooplasma nicht verwendet werden sollten, um bestmögliche Ergebnisse zu erhalten. Dieselben Untersucher geben in einer weiteren Veröffentlichung an, daß die Häufigkeit degenerierter Oozyten nach der *in vitro*-Reifung besonders hoch war, wenn die Follikel der gewonnenen Oozyten einen Durchmesser von 5 – 10 mm hatten (44 % degeneriert) und wenn der größte Follikel pro Ovarienpaar  $\leq 10$  mm war (63 % degeneriert). Die Konsistenz des Follikels hatte keinen Einfluß auf Oozytenreifung (DelCampo et al. 1995). Bestätigt wurde auch die geringe Eignung von Oozyten trächtiger Stuten, welche nach Reifung zu 66 % degeneriert waren. Der Lutealstatus hatte ebenfalls Einfluß auf die Oozytenreifung. Stuten mit Corpus luteum zeigten mehr unreife und degenerierte Oozyten als Stuten ohne Gelbkörper. Die Reifungsrate betrug für Oozyten von Stuten mit Corpus luteum 41 %, ohne Corpus luteum 62 %. Im Gegensatz dazu konnten BRÜCK und Mitarbeiter keinen Einfluß des Zyklusstandes auf die Oozytenreifung feststellen (Brück et al. 1995). Auch die Jahreszeit (Mai / Juni gegenüber August / September) spielte im Bezug zur Oozytenreifung keine Rolle.

Zu diesem Ergebnis kommen auch HINRICHS und Mitarbeiter in einer späteren Untersuchung (Hinrichs und Schmidt 2000). Bestätigt werden konnte jedoch der Einfluß der Follikelgröße auf die Oozytenreifung. Oozyten aus Follikeln  $\leq 10$  mm hatten eine geringere Reifungsrate als Oozyten aus Follikeln mit einem Durchmesser von 11 – 20 mm (27 % gegenüber 46 %) . BEZARD und Mitarbeiter geben an, daß in ihrem Versuch mit steigender Größe der Follikel sowohl der Anteil an Atresie als auch die Fähigkeit zur *in vitro*-Reifung stieg (Bezard et al. 1997).

In einer anderen Untersuchung (Hinrichs und Schmidt 2000) stieg ebenfalls die Oozytenreifungsrate mit zunehmender Follikelgröße. Bei Follikeln  $\leq 20$  mm war die Reifungsrate höher für Oozyten mit expandiertem Cumulus als für solche mit kompaktem. Der Anteil an Oozyten mit kondensiertem Chromatin stieg ebenfalls mit zunehmender Follikelgröße. Dabei stand die Oozytenreifungsrate in enger Korrelation zum Vorhandensein von kondensiertem Chromatin zum Zeitpunkt der Oozytengewinnung. Oozyten mit diffusem Chromatin wurden vor allem in Follikeln  $\leq 20$  mm mit kompakter Granulosa (Indikator für die Entwicklungsfähigkeit des Follikels) gefunden. Daraus wurde geschlossen, daß das wichtigste Zeichen zur Chromatinkondensation und somit der Erwerb der meiotischen Kompetenz bei in der Entwicklung stehenden Follikeln über 20 mm gesetzt wird. Die Chromatinkondensation bei Oozyten aus kleineren, scheinbar in der Entwicklung stehenden Follikeln könnte dagegen ein prä-atretisches Stadium repräsentieren.

Auch das Alter der Oozytenspenderstute scheint die Reifung *in vitro* zu beeinflussen (Brinsko et al. 1995). So erreichten Oozyten von Stuten  $< 15$  Jahre wesentlich häufiger die Metaphase II als Oozyten von Stuten  $\geq 15$  Jahre. Desweiteren scheinen Oozyten von Stuten  $> 15$  Jahre eine längere Reifungszeit bis zur Erreichung von Metaphase II zu benötigen.

Die Reifungsrate von Oozyten, welche fünf bis sechs, sechs bis sieben oder sieben bis acht Stunden nach der Schlachtung von Stuten gewonnen wurden, war identisch (Shabpareh et al. 1993). In einem anderen Experiment wurde die Oozytenreifung nach kurzer (1,5 bis vier h bei 37-32°C) und langer (sechs bis acht h bei 37-27,5°C) Lagerung der Ovarien vor der Oozytengewinnung untersucht (Guignot et al. 1999). Dabei zeigte sich, daß die zytoplasmatische Membran nach kurzer Lagerung meist intakt war, während sie nach langer Lagerung häufiger unregelmäßig erschien oder nicht mehr vorhanden war. Die Lagerungszeit hatte keinen Effekt auf die Kernreifungsrate nach 30 h Kultur. Vollständig gereifte Oozyten wurden jedoch häufiger bei Oozyten mit intakter zytoplasmatischer Membran beobachtet. Demnach sollte die Lagerung der Ovarien bis zur Oozytengewinnung maximal vier Stunden

betragen. LOVE und Mitarbeiter kamen zu dem Ergebnis, daß die Aufbewahrung gewonnener Oozyten für ein bis vier Stunden in Medium bei Raumtemperatur vor Beginn der Reifung (verzögerte Reifung) die Anzahl an Oozyten in Metaphase II nach 24 h Kultur erhöht (Love et al. 2002). Die Reifungsrate betrug 93 % gegenüber 53 % bei sofort nach Gewinnung gereifter Oozyten. Insgesamt wurde die Anzahl der Oozyten, die in die Meiose eintraten, oder die Anzahl degenerierter Oozyten durch die verzögerte Reifung gegenüber der sofortigen Reifung jedoch nicht verändert.

### **10.11   Schlußfolgerung**

Die Möglichkeit der erfolgreichen *in vitro*-Reifung der Oozyten ist essentiell zur *in vitro*-Produktion von Embryonen. Die Reifung von Pferdeoozyten ist in verschiedenen Kulturmedien mit unterschiedlichen Serumzusätzen, Hormonen, somatischen Zellen und weiteren Faktoren möglich. Die Oozyten können einzeln oder in Gruppen gereift werden bei Temperaturen zwischen 37,5°C und 39,0°C. Nach 30 stündiger Kultur in TCM 199 bei 39°C in wasserdampfgesättigter 5 %iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre erreichen etwa 50 bis 80 % der Oozyten die Metaphase II. Oozyten mit teilweise expandiertem Cumulus haben eine höhere Reifungsrate als Oozyten mit kompaktem Cumulus und zeigen ein Maximum an Metaphase II Oozyten schon nach 24 h. Die Reifungsrate kann zudem von Eigenschaften der Stute, des Ovars, des Follikels und der Oocyte beeinflusst werden.

## 11. Transfer von unbefruchteten Oozyten

Der erste erfolgreiche Oozytentransfer wurde 1988 von MC KINNON und Mitarbeitern berichtet (McKinnon et al. 1988). Sie übertrugen 30 *in vivo* gewonnene, gereifte Oozyten in die Eileiter besamter Stuten und erhielten ein lebend geborenes Fohlen. Bisher wurde der Transfer von Oozyten auf drei Arten beschrieben: chirurgischer Transfer in den Eileiter, Gamete Intrafallopian Tube Transfer (GIFT) und intrafollikulärer Transfer.

### 11.1 Chirurgischer Transfer in den Eileiter

#### 11.1.1 Empfängerstuten

Der Grad der notwendigen Zyklussynchronisation zwischen Spender- und Empfängerstute für einen erfolgreichen Oozytentransfer ist derzeit noch nicht genau bekannt. Die Synchronität von Spender- und Empfängerstute sollte deshalb so eng als möglich gewählt werden. Methoden zur Zyklussynchronisation sind dem Kapitel „Synchronisation der Spender- und Empfängerstuten“ zu entnehmen.

Um zu verhindern, daß auch die Oozyte der Empfängerstute befruchtet wird, muß vor dem Transfer die Follikelpunktion durchgeführt werden (Hinrichs et al. 1998; Carnevale et al. 2000). Durch die transrektale Ultraschalluntersuchung kann während der ersten fünf Tage nach dem Transfer die eventuelle Ovulation weiterer Follikel untersucht werden (Hinrichs et al. 1998). SCOTT und Mitarbeiter (Scott et al. 2001) berichten von besseren Embryoentwicklungsraten am Tag 16 (82 % gegenüber 43 % (Carnevale et al. 2000)) nach dem Transfer von *in vivo* gereiften, sofort übertragenen Oozyten ohne die Aspiration des präovulatorischen Follikels der Empfängerstute. Die Autoren vermuten, daß durch die Aspiration des Follikels eine Irritation des Reproduktionstraktes stattfindet oder die Uteruskontraktilität vermindert wird, was zu geringeren Trächtigkeitsraten führen könnte (Scott et al. 2001). Der Nachteil dieser Methode besteht darin, daß die entstandenen Embryonen aus den Oozyten der Spender- bzw. Empfängerstuten stammen können.

Eine Alternative bietet die Verwendung hormonbehandelter Empfängerstuten. CARNEVALE und Mitarbeiter berichten von vergleichbaren Trächtigkeitsraten bei der Verwendung von azyklischen Empfängern und Empfängerstuten im Zyklus (Carnevale et al.

2001). Der Vorteil dieser Methode besteht darin, daß sowohl eine Synchronisation von Spender und Empfänger entfällt, als auch die Notwendigkeit der Follikelaspiration bei der Empfängerstute. Hierzu wird die Ovaraktivität der Empfängerstute unterdrückt und der Transfer erfolgt, wenn nur kleine Follikel auf dem Ovar vorhanden sind (Hinrichs et al. 1999). Beispiel eines Behandlungsschemas einer Empfängerstute nach HINRICHS (Hinrichs et al. 1999; Hinrichs et al. 2000):

<b>Zeitpunkt</b>	<b>Behandlung</b>
ab Tag 2 post ovulationem	150 mg Progesteron + 10 mg Östradiol 17 $\beta$ in öliger Suspension i.m. 1x täglich
Tag – 6 vor dem Transfer	letzte Injektion Progesteron + Östradiol 17 $\beta$ 9 mg PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub> i.m.
Tag – 4 vor dem Transfer	9 mg PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub> i.m.
Tag – 4 und – 3 vor dem Transfer	3,3 mg Östradiol 17 $\beta$ i.m. 1x täglich
Tag – 2 vor dem Transfer	3,3 mg Östradiol 17 $\beta$ i.m. 2x täglich
Tag – 1 vor dem Transfer	Insemination
Tag 0 = Tag des Transfers	chirurg. Oozytentransfer in den Eileiter

Durch die Behandlung mit Östradiol 17 $\beta$  sollten die steigenden Östrogenkonzentrationen, welche im Zusammenhang mit einem wachsenden Follikel auftreten und ihren Peak 1 bis 2 Tage vor der Ovulation erreichen, simuliert werden. Der Durchmesser der auf dem Ovar der Empfängerstute vorhandenen Follikel war in diesem Fall an den Tagen – 4 bis zum Transfer nicht größer als 12 mm, wobei Follikel  $\geq 20$  mm zum Zeitpunkt des chirurgischen Transfers aspiriert werden sollten. Nach dem Oozytentransfer erhielten die Stuten Progesteron i.m. verabreicht. Die Dosis betrug am ersten Tag nach dem Transfer 75 mg, am zweiten Tag 150 mg und danach täglich 300 mg bis ungefähr Tag 50. Danach wurde täglich Altrenogest in einer Dosis von 26,4 mg per os verabreicht, bis Progesteron im Blut in ausreichender Konzentration nachgewiesen werden konnte (Hinrichs et al. 1999; Hinrichs et al. 2000).

Ein Nachteil des hier verwendeten Hormonprogrammes ist, daß nach der Beendigung der Injektionen nur ein relativ kleines Zeitfenster (ca. drei bis acht Tage) für die Durchführung des Transfers zur Verfügung steht. Dies erklärt sich darin, daß die Behandlung mit der Kombination Progesteron / Östradiol zwar sehr effektiv die Ovaraktivität unterdrückt, zur Vorbereitung der Empfängerstute auf den Transfer jedoch unterbrochen werden muß. Für eine normale Embryoentwicklung scheint es notwendig zu sein, daß der Beginn der

Progesteronbehandlung bei der Empfängerstute mit dem Zeitpunkt der Ovulation bei der Spenderstute synchronisiert werden muß. Um sicher zu gehen, daß der Uterus der Empfänger gut auf die Progesteronbehandlung nach dem Transfer reagiert, wurde die Behandlung mit Progesteron für fünf bis sieben Tage (Dauer einer Rosse) ausgesetzt (Hinrichs et al. 2000). Stuten zeigen allerdings schon zehn bis 13 Tage nach dem Ende einer Behandlung mit Progesteron + Östradiol sprungreife Follikel (Loy et al. 1981). Diese Methode zur Unterdrückung der Ovaraktivität ist zu kompliziert, andere klinisch anwendbare Programme sind bisher jedoch noch nicht bekannt.

Die Verwendung ovariektomierter Empfängerstuten zum Oozytentransfer scheint aufgrund der postoperativen Adhäsionen und Vernarbungen nicht geeignet zu sein (Hinrichs et al. 2000).

### **11.1.2 Besamung**

Die Besamung der Empfängertiere kann vor, nach oder vor und nach dem Oozytentransfer erfolgen. Die Samenportion wird intrauterin plaziert. HINRICHS und Mitarbeiter besamten einen Tag vor und zwei bis fünf Stunden nach dem Oozytentransfer mit  $10^9$  Spermien eines fertilen Hengstes (Hinrichs et al. 1998). In einer anderen Untersuchung erfolgte die Besamung mit  $2 \times 10^9$  vorwärtsbeweglichen Spermien zwei Stunden nach dem Transfer. Wenn Oozyten übertragen wurden, welche noch im Eileiter reifen mussten, wurde erst 14 – 16 h nach dem Transfer besamt. Die Embryoentwicklungsrate am Tag 16 war hier für beide Gruppen gleich (Carnevale et al. 2000). Auch die Besamung 12 – 18 h vor dem Oozytentransfer ist beschrieben (Scott et al. 2001). Verschiedene Besamungszeitpunkte mit frischem oder gekühlt transportiertem Sperma wurden von CARNEVALE und Mitarbeitern getestet (Carnevale et al. 2001). Die Empfängerstuten wurden mit frischem oder gekühltem Sperma entweder 14 h vor oder zwei Stunden nach dem Transfer mit jeweils  $2 \times 10^9$  vorwärtsbeweglichen Spermien besamt. Wenn sowohl 12 h vor als auch zwei Stunden nach dem Transfer besamt wurde, verwendete man jeweils  $1 \times 10^9$  vorwärtsbeweglichen Spermien. Die besten Trächtigkeitsraten ergaben sich, wenn frisches Sperma fertiler Hengste vor dem Oozytentransfer deponiert wurde oder bei Verwendung von gekühltem Sperma vor und nach dem Oozytentransfer. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß die Besamung vor und nach dem Transfer bei Sperma mit verminderter Qualität von Vorteil sein könnte. Wird frisches Sperma fertiler Hengste verwendet, erscheint eine einmalige Besamung vor dem Transfer ausreichend zu sein. Das



Intervall von der Besamung bis zum Transfer sollte dabei jedoch mindestens 12 h betragen, besonders wenn nach dem Transfer noch einmal besamt werden soll (Carnevale et al. 2001). Man vermutet, daß es bei einem Intervall zwischen Besamung und Oozytentransfer unter 12 h zu einer Beeinflussung durch die physiologische Entzündungsreaktion des Uterus auf die Besamung kommen könnte (Williamson et al. 1987).

### 11.1.3 Technik

Der Eingriff wird an der stehenden Stute von der Flanke aus durchgeführt. Die Deponierung der Oocyte ipsi- oder kontralateral des dominanten präovulatorischen Follikels scheint dabei keine Auswirkung auf die Trächtigkeitsraten zu haben (Carnevale und Ginther 1995). Nach Sedation, Analgesie und Lokalanalgesie erfolgt die ca. 15 cm lange Inzision direkt cranial des Tuber coxae (Hinrichs et al. 1998) bzw. zwischen letzter Rippe und Tuber coxae (Carnevale et al. 2000). Nach der Durchtrennung von Haut und Bauchmuskeln wird die Bauchhöhle eröffnet und das Ovar vorgelagert. Mit Hilfe zweier 20 G Kanülen wird der Cumulus auf eine Breite, welcher in etwa die Hälfte des Oozytendurchmessers entspricht, verschmälert (Hinrichs et al. 1998; Scott et al. 2001). Nun wird die Oocyte mit weniger als 0,5 ml (Hinrichs et al. 1998) bzw. 0,2 ml Medium (Carnevale et al. 2000; Scott et al. 2001) in eine sterile Glas-Pipette aufgezogen. Diese ist über einen elastischen Schlauch mit einer Spritze verbunden. Mit stumpfen Pinzetten wird das Infundibulum des Eileiters erfasst und leicht vom Ovar weggezogen (Hinrichs et al. 1998). Die Öffnung der Eileiterampulle wird mit einer geraden Moskitoklemme identifiziert (Hinrichs et al. 1998) und die Pipette 2 bis 3 cm in den Eileiter eingeführt (Hinrichs et al. 1998; Carnevale et al. 2000; Scott et al. 2001). Dort wird die Oocyte deponiert. Um sich zu vergewissern, daß die Oocyte transferiert wurde, wird die Pipette mit dem Medium noch einmal in eine Petrischale durchspült (Hinrichs et al. 1998). Das Ovar wird in die Bauchhöhle zurückverlagert und die Inzision verschlossen. Den Stuten wird ein Antibiotikum und eventuell auch Flunixin-Meglumin verabreicht (Hinrichs et al. 1998).

Sowohl Xylazin als auch Flunixin-Meglumin können Einfluß auf die Eileitermotilität haben. Xylazin erhöht bei Pferden die Uterusmotilität (Gibbs und Troedsson 1995) und kann ebenso die Eileitermotilität beeinflussen. In der beschriebenen Untersuchung wurde Xylazin jedoch ohne Probleme verwendet (Hinrichs et al. 1998). Flunixin-Meglumin ist ein Prostaglandin-Inhibitor, welcher Einfluß auf die Eileiter- und Uterusmotilität haben kann. Die

Reduktion der Uterusmotilität kann die Entwicklung einer Endometritis nach der Belegung fördern, besonders wenn die Besamung direkt nach dem Transfer durchgeführt wird (Hinrichs et al. 1998). Stuten, welche nach dem Transfer bzw. der Besamung Ausfluß, Luft oder Flüssigkeit im Uterus zeigen, können mit Oxytocin behandelt werden (Hinrichs et al. 1999; Hinrichs et al. 2000). CARNEVALE und Mitarbeiter berichten sogar, daß die Gabe von Oxytocin zum Zeitpunkt des Oozytentransfers zu deutlich höheren Trächtigkeitsraten führte (65 % gegenüber 33 % ohne Oxytocin), vermutlich durch eine Unterstützung des Spermien- oder Oozytentransportes im Eileiter. Die Gabe von Oxytocin nach dem Oozytentransfer hat dagegen die Trächtigkeitsraten nicht beeinflußt (Carnevale et al. 2001).

Die Entwicklung der Embryonen nach dem Transfer von Oozyten scheint gegenüber natürlich entstandenen Embryonen eventuell um einen Tag verzögert zu sein. Es wird vermutet, daß die *in vitro*-Manipulation das Embryonalwachstum verzögert (Carnevale und Ginther 1995).

#### **11.1.4 Trächtigkeits- bzw. Embryoentwicklungsraten**

Werden Oozyten junger Spendertiere in die Eileiter junger Empfängertiere übertragen, sind Trächtigkeitsraten bis zu 92 % möglich (Carnevale und Ginther 1995). Für Oozyten älterer Spenderstuten, welche in die Eileiter junger Empfängerstuten übertragen werden, geben dieselben Untersucher eine Trächtigkeitsrate von 31 % an. Die Trächtigkeitsraten anderer Untersucher liegen zwischen 13 % (McKinnon et al. 1988) und 82 % (Scott et al. 2001). Aus einem kommerziellen Oozytentransferprogramm mit älteren Oozytenspendern werden Trächtigkeitsraten von 30 bis 40 % pro Oozyte berichtet (die Trächtigkeitsrate pro Oozyte entspricht der Embryoentwicklungsrate, wird nur eine Oozyte übertragen gilt Trächtigkeitsrate = Embryoentwicklungsrate). Am meisten beeinflußt wird der Erfolg eines Oozytentransfers von der Qualität der Oozyte, dem Alter der Spenderstute und der Samenqualität (Carnevale et al. 2001). Oozyten, welche *in vitro* gereift wurden, führten zu sehr geringen Embryoentwicklungsraten (9 %), wobei kein Unterschied zwischen *in vivo* gewonnenen Oozyten und Oozyten aus Schlachthofovarien bestand (Scott et al. 2001). Dies läßt vermuten, daß die *in vitro*-Reifungssysteme nicht zu einer ausreichenden Kern- und Zytoplasmareifung führen (Squires et al. 2003).

Vergleicht man den Transfer von Oozyten, welche 24 h nach hCG-Injektion gewonnen und 12 h *in vitro* gereift wurden mit dem Transfer von Oozyten, welche 35 h nach

hCG-Injektion gewonnen und sofort übertragen wurden, so kann man keinen Unterschied in der Trächtigkeitsrate feststellen (Hinrichs et al. 2000). CARNEVALE und Mitarbeiter verglichen den Transfer von Oozyten, welche 24 h nach hCG-Injektion gewonnen wurden und für 12-14 h *in vitro* kultiviert wurden mit solchen, welche sofort nach der Gewinnung übertragen wurden. Es wurde kein Unterschied bezüglich der Trächtigkeitsrate zwischen den gereiften oder sofort übertragenen Oozyten festgestellt. Die Untersucher zogen daraus den Schluß, daß Pferdeoozyten die letzten Reifungsschritte erfolgreich im Eileiter abschließen können (Carnevale et al. 2000). Die Reifung von im Diöstrus gewonnenen, immaturren Oozyten im Eileiter scheint dagegen nicht erfolgreich zu sein (Scott et al. 2001).

## 11.2 Gamete Intrafallopian Tube Transfer (GIFT)

Für den Oozytentransfer mit intrauteriner Besamung der Empfängerstute werden die in der künstlichen Besamung üblichen hohen Samendosen benötigt. Beim GIFT werden sowohl die Oozyten als auch die Spermien in den Eileiter übertragen. Bei der Besamung in den Eileiter sind nur geringe Spermienzahlen notwendig. So konnte nach der Besamung in den Eileiter mit  $5 \times 10^4$  vorwärtsbeweglichen Spermien kein signifikanter Unterschied in der Trächtigkeitsrate gegenüber der Besamung in den Uterus mit  $5 \times 10^8$  vorwärtsbeweglichen Spermien festgestellt werden (McCue et al. 2000). Deshalb eignet sich der GIFT für Hengste mit reduzierter Samenqualität, für gefrorenes oder für gesextes Sperma (Squires et al. 2003). Die Technik der Übertragung entspricht jener beim Transfer der Oozyten. Spender- und Empfängerstute müssen zyklussynchron sein.

Der erste erfolgreiche GIFT wurde 1998 durchgeführt. Es wurde eine azyklische, hormonbehandelte Stute verwendet, welcher eine Oozyte und 500.000 Spermien übertragen wurden (Carnevale et al. 1999). In zwei weiteren Untersuchungen am selben Institut konnte nach GIFT am Tag 16 eine Embryoentwicklungsrate von 27 % (Carnevale et al. 2000) bzw. 55 % (Carnevale et al. 2001) erzielt werden. Das zu übertragende Sperma wurde ca. eine Stunde vor dem Transfer gewonnen und über einen Percoll Gradienten separiert (90/45 % Percoll, für 10 min. bei 300 G zentrifugiert). Das Spermienpellet wurde entnommen und in 3 ml HEPES-gepufferter synthetischer Eileiterflüssigkeit (H-SOF mit 0,6 % BSA) gewaschen, gefolgt von einer weiteren Zentrifugation für 5 min. bei 300 G. Das Spermienpellet wurde dann in H-SOF suspendiert. Die Oozyten und 500.000 vorwärtsbewegliche Spermien wurden separat in  $\leq 0,3$  ml H-SOF (Carnevale et al. 2000) bzw. die Oozyten und 200.000

vorwärtsbewegliche Spermien kombiniert (Carnevale et al. 2001) in die Eileiter der Empfängerstuten übertragen. Die Kombination der Gameten vor dem Transfer und das dadurch kleinere Transfervolumen könnten zu den besseren Embryoentwicklungsraten geführt haben. Beim Vergleich der Embryoentwicklungsraten nach GIFT und intrauteriner Besamung konnte kein Unterschied festgestellt werden (Carnevale et al. 2001; Coutinho da Silva et al. 2002). Verglichen wurde auch die Eignung von Oozyten, welche zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach hCG-Injektion von den Spenderstuten gewonnen wurden. Oozyten, welche 22 h nach hCG-Injektion gewonnen wurden, scheinen sich für den GIFT besser zu eignen als 33 h nach hCG gewonnene Oozyten (Coutinho da Silva et al. 2002).

Die Embryoentwicklungsraten nach GIFT bei der Verwendung von Tiefgefriersperma (200.000 Spermien) betrugen nur 8 % (Carnevale et al. 2001). Auch bei konventioneller Besamung wurde eine geringere Fertilität des Tiefgefrierspermas gegenüber frischem Sperma beobachtet (Squires et al. 1999). Ebenso war *in vitro* die Bindungskapazität von Tiefgefriersperma an Eileiterepithelzellen und die Zona pellucida gegenüber frischem Sperma deutlich reduziert (Dobrinski et al. 1995).

COUTINHO DA SILVA und Mitarbeiter verglichen die Verwendung von frischem, gekühltem und tiefgefrorenem Sperma beim GIFT (Coutinho da Silva et al. 2002). Dabei entwickelten sich bei der Verwendung von frischem Sperma deutlich mehr Embryonen (82 %) als nach der Verwendung von gekühltem (25 %) oder tiefgefrorenem Sperma (8 %). Das frische Sperma wurde eine Stunde vor dem Transfer gewonnen, das Tiefgefriersperma befand sich in 0,5 ml Pailletten mit Lactose-EDTA-Verdüner. Frisches und tiefgefrorenes Sperma (200.000 vorwärtsbewegliche Spermien) wurde zusammen mit den Oozyten übertragen. Gekühltes Sperma wurde 24 h vor dem Transfer gewonnen und mit einem Magermilchverdünner bei 5°C in einer speziellen Kühlbox (Equitainer®) deponiert. Der präovulatorische Follikel der Empfängerstuten wurde bei diesen Untersuchungen nicht aspiriert. Der Transfer wurde kontralateral zur Ovulation durchgeführt. Die gewonnenen Embryonen wurden mittels PCR identifiziert; eine Befruchtung der Oocyte der Empfängerstuten fand nicht statt. Somit können Stuten im Zyklus ohne Aspiration des präovulatorischen Follikels als Empfänger beim GIFT dienen.

Eine Kapazitation der Spermien vor dem GIFT scheint nicht notwendig zu sein. Eventuell wird der Prozess der Kapazitation durch die Zentrifugation durch Percoll eingeleitet, was dann beim GIFT von Vorteil sein könnte (Carnevale et al. 2000; Coutinho da Silva et al. 2002). Die niedrigeren Embryoentwicklungsraten bei der Verwendung von gekühltem oder gefrorenem Sperma könnten durch Veränderungen der Spermien während des

Kühlungs- bzw. Einfrierprozesses erklärt werden (Troedsson et al. 1998), welche eine reduzierte Lebensfähigkeit der Spermien bewirken. Zusätzlich könnten die Wechselwirkungen zwischen den Spermien und dem Eileiterepithel durch Komponenten der Spermaverdünner beeinflusst worden sein.

### 11.3 Intrafollikulärer Transfer von Oozyten

Beim intrafollikulären Transfer werden immature Oozyten von Spenderstuten oder Schlachthofovarien in den präovulatorischen Follikel von Empfängerstuten übertragen. Der intrafollikuläre Transfer von Oozyten kann dazu dienen, die Anforderungen an die Oozytenreifung näher zu definieren oder Wechselwirkungen zwischen Oozyte und Follikel zu untersuchen. Für Untersuchungen zur frühembryonalen Entwicklung könnten so eine größere Anzahl reifer und befruchteter Oozyten und früher Embryonen gewonnen werden (Hinrichs und DiGiorgio 1991). Da für den intrafollikulären Transfer keine Reifung der Oozyten *in vitro* notwendig ist, erfordert diese Technik kein speziell ausgestattetes Labor. Da allerdings der Follikel und die Oozyte der Empfängerstute intakt bleiben müssen, können sowohl die Oozyte der Spender- als auch der Empfängerstute befruchtet werden. Dies erfordert die Gewinnung der Embryonen durch eine Spülung des Uterus der Empfängerstute und deren Transfer auf weitere Empfängerstuten. Die Fohlen können dann durch eine Blutgruppenbestimmung identifiziert werden. Eine Markierung der Spenderoozyte, anhand derer der resultierende Embryo identifiziert werden könnte, ist bisher noch nicht möglich (Hinrichs 1997).

Soll eine Oozyte von einer Spender- in eine Empfängerstute transferiert werden, müssen deren Zyklen synchronisiert werden. Der Transfer wird durchgeführt, wenn bei der Spenderstute ein Follikel mit einem Durchmesser von  $\geq 30$  mm vorhanden ist. Dieser und auch kleinere sichtbare Follikel werden transvaginal aspiriert, es wird kein hCG verabreicht. Die Oozyten werden bis zum Transfer in Medium bei 39°C aufbewahrt. Die Autorin empfiehlt, alle Oozyten ohne Berücksichtigung der Morphologie zu übertragen (Hinrichs 1997). Hierzu werden die Oozyten mit einer 10 ml Spritze in einen Verlängerungs-Infusionsschlauch aufgezogen, an dessen anderem Ende ein Dreiwegehahn angebracht wird. Am zweiten Ausgang des Dreiwegehahnes wird eine 10 ml Spritze befestigt und am dritten ein weiterer Verlängerungs-Infusionsschlauch, an dessen Ende sich die Follikelpunktionsnadel befindet. Der Follikel der Empfängerstute wird entweder von der Flanke aus oder transvaginal

punktiert. Zunächst werden 10 ml der Follikelflüssigkeit in die Spritze, welche am Dreiwegehahn befestigt ist, aspiriert. Danach wird das Medium mit den Oozyten in den Follikel injiziert, gefolgt von 5 ml der Follikelflüssigkeit. So kann man sicher sein, daß die Oozyten aus dem Infusionsschlauch gespült wurden. Nach der Entfernung der Punktionsnadel kann es zu einer mit Ultraschall sichtbaren Verkleinerung des Follikels kommen, echogene Flecken innerhalb des Follikels entstehen durch während des Transfers eingebrachte Luft. Nach dem Transfer wird der Empfängerstute hCG verabreicht. Die Besamung findet am folgenden Tag statt. Kommt es zu größeren Blutungen in den Follikel, wird die Ovulation wahrscheinlich verhindert. Die Embryogewinnung wurde sieben bis elf Tage nach dem Transfer durchgeführt (Hinrichs und DiGiorgio 1991; Hinrichs 1997).

In einer ersten Untersuchung mit Oozyten aus Schlachthofovarien wurden 20 Transfers durchgeführt, wobei pro Follikel sieben bis 18 COCs übertragen wurden. Sechzehn der Stuten ovulierten. Drei dieser Stuten wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt, da sie Oozyten mit nicht intakten Cumuli erhalten hatten. Von den restlichen 12 Stuten konnten 18 Embryonen gewonnen werden, wovon einer morphologische Veränderungen zeigte. Die meisten Embryonen wurden von einer Stute gewonnen, welche ausschließlich Oozyten mit expandierten Cumuli erhalten hatte. Die Autoren vermuten, daß die Reifung der COCs mit der Entfernung aus dem Follikel beginnt (Hinrichs und DiGiorgio 1991). Nachdem die COCs in den Follikel der Empfängerstute übertragen wurden, kommen sie wahrscheinlich auf der Granulosaschicht zu liegen (Fleming et al. 1985). Falls die übertragenen COCs zum Zeitpunkt der Ovulation noch immatur sind, können sie eventuell den Follikel nicht verlassen, da sie an der Granulosa haften. Der Zeitpunkt der Ovulation muß demnach mit der benötigten Reifungszeit übereinstimmen. Dies war der erste erfolgreiche intrafollikuläre Transfer aller Spezies (Hinrichs und DiGiorgio 1991).

In einer weiteren Untersuchung wurden Oozyten übertragen, welche 24 h nach hCG-Gabe gewonnen wurden. Auch die sieben Empfängerstuten erhielten hCG, der transvaginale Transfer wurde 24 h später durchgeführt. Dabei wurde der Follikel entweder mit einer 18 G Kanüle zum Transfer punktiert oder es wurde eine 16 G Kanüle verwendet, durch welche ein Polyethylenschlauch zur Oozytenübertragung geschoben wurde. Die Stuten wurde dann innerhalb von zwei Stunden besamt. Zwei der Stuten entwickelten zwei Embryonen, zwei Stuten jeweils einen Embryo und drei Stuten waren nicht trächtig (Carnevale und Ginther 1993).

Bei der Verwendung von Maultieren als Empfängerstuten konnte aus neun Transfers von *in vivo* gereiften Oozyten eine Trächtigkeit etabliert werden (Palmer et al. 1997). Durch

die Verwendung der Maultierstuten könnte das Problem der empfängereigenen Oozyte umgangen werden. Grundsätzlich ist die Reproduzierbarkeit der Methode des intrafollikulären Transfers derzeit jedoch eher gering (Hinrichs 1998).

#### 11.4 Schlußfolgerung

Die *in vitro*-Reifung von im Östrus gewonnenen Oozyten kann durch deren Transfer in den Eileiter, durch den Gamete Intrafallopian Tube Transfer (GIFT) oder durch den intrafollikulären Transfer ersetzt werden. Während beim GIFT auch die Spermien in den Eileiter übertragen werden, erfolgt bei den beiden anderen Methoden der Transfer auf konventionell besamte Empfängerstuten. Der Transfer von Oozyten in den Eileiter und der GIFT werden an der stehenden Stute chirurgisch von der Flanke aus durchgeführt, die Übertragung in den Follikel erfolgt entweder durch Follikelpunktion von der Flanke aus oder transvaginal. Der Vorteil des GIFT ist, daß nur geringe Spermienzahlen notwendig sind, weshalb sich diese Methode besonders für subfertile Hengste, Tiefgefriersperma und gesextes Sperma eignet. Spender- und Empfängerstuten müssen vor dem Oozytentransfer synchronisiert werden. Für den Transfer in den Eileiter und für den GIFT können alternativ auch hormonbehandelte, nicht-ovulierende Empfänger verwendet werden. Embryoentwicklungsraten bis zu 92 % sind möglich, aus kommerziellen Programmen werden Trächtigkeitsraten von 30 bis 40 % berichtet. Für *in vitro* gereifte Oozyten und für gekühltes oder tiefgefrorenes Sperma liegen die Embryoentwicklungsraten jedoch mit unter 10 % deutlich niedriger. Der intrafollikuläre Transfer von Oozyten bietet den Vorteil, daß immature, im Diöstrus gewonnene Oozyten nicht *in vitro* gereift werden müssen. Da allerdings der Follikel der Empfängerstute intakt bleiben muß, können sowohl die Oocyte der Spender- als auch der Empfängerstute befruchtet werden. Dies erfordert die Gewinnung der Embryonen und deren Transfer auf weitere Empfängerstuten.

## 12. Kryokonservierung von Oozyten

Bisher gibt es zur Kryokonservierung von Stutenoozyten nur sehr wenige Untersuchungen. Eine zuverlässige Methode wäre jedoch sehr nützlich, um das genetische Material von plötzlich verstorbenen Stuten oder von Stuten, die euthanasiert werden müssen, zu erhalten. Die Kryokonservierung von Oozyten war bisher bei Menschen und verschiedenen Säugetieren erfolgreich, unter anderem bei Mäusen, Rindern und auch Pferden (Squires et al. 2003). Die Konservierung kann durch die konventionelle Kryokonservierung oder durch Vitrifikation stattfinden. Näheres zu den Prinzipien dieser Methoden können dem Kapitel „Kryokonservierung von Embryonen“ entnommen werden.

### 12.1 Konventionelle Kryokonservierung

Beim Vergleich der Kryoprotektiva Ethylenglykol, Propandiol und Glycerin zur Konservierung von immaturren Oozyten im Keimbläschenstadium konnten nach dem Auftauen bei 32 stündiger *in vitro*-Reifung 15,8 %, 5,8 % und 0 % der Oozyten die Metaphase II erreichen (Hochi et al. 1994). Dabei wurden die Oozyten zunächst für 10 min. in PBS + 10 % Kryoprotektivum + 0,1 M Saccharose inkubiert, bevor jeweils zehn bis 30 Oozyten in eine 0,25 ml-Paillette geladen wurden. Bei  $-6^{\circ}\text{C}$  fand die Induktion der Kristallisation (seeding) statt, dann wurden die Oozyten vor dem Eintauchen in flüssigen Stickstoff mit einer Abkühlrate von  $0,3^{\circ}\text{C} / \text{min.}$  auf  $-35^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Das Auftauen fand für 20 s in einem  $37^{\circ}\text{C}$  warmen Wasserbad statt.

In einem zweiten Experiment derselben Untersucher wurden entweder immature Oozyten im Keimbläschenstadium mit Ethylenglykol eingefroren und nach dem Auftauen *in vitro* gereift (Gruppe 1), oder die unreifen Oozyten wurden zunächst *in vitro* gereift und nach Erreichen der Metaphase II ebenfalls mit Ethylenglykol als Kryoprotektivum eingefroren (Gruppe 2). Nach dem Auftauen und der *in vitro*-Reifung der immatur eingefrorenen Oozyten wurde die *in vitro*-Fertilisation durchgeführt. Hierbei sollte die Penetrationsrate der beiden tiefgefrorenen Oozytengruppen mit der einer *in vitro* gereiften, jedoch nicht tiefgefrorenen Kontrollgruppe verglichen werden. Vor der Befruchtung wurde von allen Oozyten die Zona pellucida entfernt. Dabei wurden vergleichbare Anteile der kryokonservierten Oozyten und der Kontroll-Oozyten von Spermien penetriert (71,8 % in



Gruppe 1 und 79,1 % in Gruppe 2 gegenüber 77,6 % in der Kontrollgruppe) und bildeten zwei oder mehr Pronuklei (74,5 % in Gruppe 1 und 73,6 % in Gruppe 2 gegenüber 80,8 % in der Kontrollgruppe). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß sich Ethylenglykol besser als Kryoprotektivum eignet als Propandiol; Glycerin scheint ungeeignet zu sein. Sowohl immatur kryokonservierte Oozyten, welche nach dem Auftauen *in vitro* gereift wurden, als auch zunächst *in vitro* gereifte und dann tiefgefrorene Oozyten können nach der Entfernung der Zona pellucida von Hengstspermien penetriert werden und morphologisch unauffällige Pronuklei bilden.

## 12.2 Vitrifikation

HOCHI und Mitarbeiter verglichen unterschiedliche Protokolle zur Vitrifikation immaturer Oozyten, als Kryoprotektiva wurden 40 % Ethylenglykol + 18 % Ficoll + 0,3 M Saccharose in PBS verwendet (Hochi et al. 1996). Die Oozyten wurden in 6 Gruppen unterteilt, wobei Gruppe 1 bis 3 bei 20°C und Gruppe 4 bis 6 bei 30°C gehandhabt wurden. Die Versuchsanordnung war wie folgt:

- Gruppe 1 und 4: direkter Transfer der Oozyten in das Vitrifikationsmedium;
- Gruppe 2 und 5: die Oozyten werden zunächst für zehn Minuten in eine 20 %ige Ethylenglykollösung überführt;
- Gruppe 3 und 6: die Oozyten werden zunächst für 20 min. in eine 20 %ige Ethylenglykollösung überführt.

Nach dem Auftauen und 32 stündiger Kultur *in vitro* hatten in Gruppe 2, 3, 5 und 6 mehr Oozyten Metaphase II erreicht als in Gruppe 1 und 4 (16,0/ 16,7/ 10,0 und 8,2 % gegenüber 2,2 und 1,9 %). Eine stufenweise Heranführung an die Endkonzentration des Kryoprotektivums sowie eine Arbeitstemperatur von 20°C scheinen somit vorteilhaft zu sein. Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung von Oozyten nach Vitrifikation aus Gruppe 2 (Hochi et al. 1996) zeigten sich folgende Veränderungen:

- Schwellung der Mitochondrien,
- verminderte Dichte der Matrix,
- Kontaktverlust der Oozyten zu ihren umgebenden Cumuluszellen und
- das Vorhandensein von Vakuolen in der Peripherie des Ooplasmas.

In diesen Veränderungen könnte die reduzierte Lebensfähigkeit der kryokonservierten Oozyten begründet sein. Oozyten, welche dem Kryoprotektivum ausgesetzt waren, aber nicht eingefroren wurden, zeigten ähnliche Veränderungen, jedoch bis auf die Vakuolen im Zytoplasma in einem geringeren Ausmaß. Dies könnte darauf hindeuten, daß schon die Exposition an das Kryoprotektivum für die Veränderungen der Oozyten verantwortlich ist.

HURTT und Mitarbeiter verwendeten als Behältnisse zur Vitrifikation der Oozyten „Open Pulled Straws“ (Hurtt et al. 1999; Hurtt et al. 2000). Die Oozyten wurden entweder vor der Vitrifikation *in vitro* gereift oder immatur im Keimbläschenstadium eingefroren und nach dem Auftauen *in vitro* gereift; als Kryoprotektiva wurden ebenfalls Ethylenglykol + Ficoll + Saccharose verwendet (siehe Anhang Tabelle II). Als Kontrolle dienten *in vitro* gereifte, nicht eingefrorene Oozyten. Dann wurden die Oozyten nach dem Auftauen und bei immatur eingefrorenen Oozyten nach der *in vitro*-Reifung mit Hoechst 33342 zur Beurteilung der Lebensfähigkeit bzw. mit Orzein zur Beurteilung der Kernreifung gefärbt. Oozyten, die nach Färbung mit Hoechst 33342 eine homogene, hochintensive Fluoreszenz zeigten, wurden als tot beurteilt. Nach der Vitrifikation betrug der Anteil an Metaphase II für nach der Vitrifikation *in vitro* gereifte Oozyten 30 %, für vor der Vitrifikation *in vitro* gereifte Oozyten 40 % und für die nicht tiefgefrorene Kontrollgruppe 45 %. Immatur eingefrorene Oozyten scheinen somit in der Lage zu sein, nach dem Auftauen *in vitro* bis Metaphase II zu reifen. Die Lebensfähigkeit der Oozyten wurde mit 36 %, 33 % und 43 % für nach der Vitrifikation *in vitro* gereifte Oozyten, vor der Vitrifikation *in vitro* gereifte Oozyten und die Kontrollgruppe beurteilt. Somit reiften 81 % der immatur eingefrorenen Oozyten, welche als lebend beurteilt wurden, nach der Vitrifikation *in vitro* bis Metaphase II. Die Ergebnisse können auch Tabelle 23 entnommen werden. Sowohl die Kernreifung als auch die zytoplasmatische Reifung (beurteilt anhand der Wanderung der kortikalen Granula zum Oolemm) wurden von 20% der immatur eingefrorenen Oozyten, 30% der vor der Vitrifikation *in vitro* gereiften Oozyten und 45% der Kontrolloozyten beendet.

**Tabelle 23:** Reifungsraten und Lebensfähigkeit der Pferdeoozyten nach Vitrifikation in „Open Pulled Straws“ modifiziert nach HURTT (Hurtt et al. 2000)

Gruppe	Anzahl der Oozyten	% M II	% lebend	% lebende Oozyten in M II
<b>immatur eingefrorene Oozyten</b>	30	30 <sup>a</sup>	36 <sup>a</sup>	81 <sup>a,b</sup>
<b>matur eingefrorene Oozyten</b>	30	40 <sup>a,b</sup>	33 <sup>a</sup>	70 <sup>a</sup>
<b>nicht eingefrorene Kontrollgruppe</b>	28	46 <sup>a,b</sup>	43 <sup>a,b</sup>	92 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Werte innerhalb einer Spalte mit unterschiedlichen Buchstaben zeigen eine deutliche Abweichung ( $P < 0,05$ )

M II = Metaphase II

Ein Nachteil der Vitrifikation sind die hohen benötigten Konzentrationen an Kryoprotektiva, welche auf Oozyten toxisch wirken. Makromoleküle wie z.B. Zucker können diese Toxizität lindern. In einer Studie wurde der Effekt der Zugabe von Saccharose oder Trehalose zum Vitrifikationsmedium getestet (Maclellan et al. 2001). Die Oozyten wurden 12 oder 24 h nach Reifungsbeginn eingefroren. Als Kryoprotektiva wurden Ethylenglykol und DMSO verwendet, die Oozyten wurden in drei Schritten an die Endkonzentration herangeführt (siehe Anhang Tabelle II). Als Behältnis wurde ein „Cryoloop“ verwendet. Nach dem Auftauen wurden die Oozyten für 14 h bzw. zwei Stunden in Equinem Reifungsmedium I (EMMI) gereift, dann wurde die intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) durchgeführt. Bei einer nicht tiefgefrorenen Kontrollgruppe wurde nach 26 h Reifung die ICSI durchgeführt. Nach 20 stündiger Reifung wurden die Oozyten fixiert und zur Beurteilung der Pronuklei mit Azetorzein gefärbt. Die Fertilisationsrate, gemessen am Vorhandensein von zwei Pronuklei, war für die Kontrollgruppe und die Oozyten nach Vitrifikation gleich. Dabei scheint es keinen bedeutenden Unterschied bei der Verwendung der beiden Zuckerarten zu geben.

Die ersten geborenen Fohlen nach dem Transfer von kryokonservierten, *in vivo* gereiften Oozyten wurden von MACLELLAN und Mitarbeitern berichtet (Maclellan et al. 2002). Die Oozyten wurden 24 – 26 h nach hCG-Applikation von stimulierten (equines Hypophysenextrakt) oder nicht-stimulierten Stuten durch transvaginale Follikelpunktion gewonnen. Die Stimulation des Follikelwachstums mit equinem Hypophysenextrakt erhöhte zwar die Anzahl der präovulatorischen Follikel pro Stute, nicht jedoch die Anzahl der

gewonnenen Oozyten. Der Anteil an morphologisch unauffällig erscheinenden Oozyten war für stimulierte und nicht-stimulierte Stuten gleich. Nach zwei bis vier Stunden in EMMI wurden die Oozyten vorsichtig so lange pipettiert, bis sie nur noch von acht bis zehn Cumuluszellreihen umgeben wurden. In drei Schritten fand die Überführung in das Vitrifikationsmedium statt (siehe Anhang Tabelle II), als Kryoprotektiva wurden 20 % (2,8 M) DMSO, 20 % (3,6 M) Ethylenglykol, 10 mg/ml Ficoll und 0,65 M Saccharose in modifiziertem G2 Medium verwendet. Ein „Cryoloop“ diente als Behältnis für die Oozyten. Nach zwei Monaten Lagerung in flüssigem Stickstoff wurden die Oozyten aufgetaut und die Kryoprotektiva in drei Schritten verdünnt. Nach zehn bis 12 h Kultur in EMMI wurden die Oozyten auf die besamten Empfängerstuten übertragen (jeweils zwei bis fünf Oozyten pro Empfängerstute). Von den insgesamt 26 kryokonservierten Oozyten zeigten sieben nach dem Auftauen morphologische Veränderungen, diese wurden nicht übertragen. Nach dem Transfer der 19 kryokonservierten Oozyten entwickelten sich drei Embryonen, dabei zwei in einer Stute. Einer dieser Zwillingsembryonen wurde beseitigt. Insgesamt wurden zwei lebende Fohlen geboren. Die Embryoentwicklungsrate der eingefrorenen Oozyten lag mit 12% jedoch deutlich niedriger als jene der Kontrollgruppe mit 83 %.

### 12.3     **Schlußfolgerung**

Die Konservierung von Oozyten ist sowohl durch die konventionelle Kryokonservierung als auch durch Vitrifikation möglich. Als Kryoprotektivum scheint Ethylenglykol in Verbindung mit DMSO und / oder Makromolekülen am besten geeignet zu sein; von Vorteil erwies sich dabei eine stufenweise Heranführung an die Endkonzentration des Kryoprotektivums. Tiefgefrorene Oozyten zeigten in den bisherigen Untersuchungen eine geringere Reifungsrate als ungefrorene Oozyten, die Befruchtungsraten nach *in vitro*-Fertilisation bzw. ICSI waren bei gefrorenen und ungefrorenen Oozyten jedoch gleich. Bisher wurden nach dem Oozytentransfer kryokonservierter Oozyten zwei Fohlen geboren; die Embryoentwicklungsrate von kryokonservierten Oozyten war bisher gegenüber nicht kryokonservierten Oozyten deutlich niedriger. Die Konservierung von Oozyten wäre vor allem interessant, um das genetische Material von plötzlich verstorbenen oder euthanasierten Stuten zu erhalten.

### 13. *In vitro*-Fertilisation (IVF)

Beim Pferd ist die Produktion von Embryonen durch *in vitro*-Fertilisation kein Routineverfahren. Die Technik wäre allerdings sehr hilfreich für Stuten mit bestimmten Fertilitätsproblemen und für Hengste mit geringen Spermienkonzentrationen oder schlechter Spermienqualität. Auch als Parameter für die Beurteilung von Tiefgefriersperma oder von *in vitro* gereiften oder tiefgefrorenen Oozyten könnte die IVF eingesetzt werden. Es könnten zudem Embryonen für Folgeexperimente wie die Embryokonservierung oder die Embryokultur *in vitro* bereitgestellt werden. Die zwei wichtigsten Faktoren, welche für eine erfolgreiche *in vitro*-Fertilisation verantwortlich sind, sind die *in vitro*-Reifung der Oozyten und die Spermienkapazitation *in vitro* (Squires et al. 2003). Die Befruchtung *in vitro* ist möglich durch die Standardtechniken der IVF oder durch sogenannte assistierte Fertilisationstechniken wie Zona drilling oder intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI). Dabei können entweder *in vivo* oder *in vitro* gereifte Oozyten verwendet werden.

#### 13.1 Standardtechniken der *in vitro*-Fertilisation

Durch die Standardtechniken der IVF konnten bisher nur zwei lebend geborene Fohlen erzeugt werden, wobei die Oozyten in beiden Fällen aus präovulatorischen Follikeln gewonnen worden waren (Palmer et al. 1991; Bezard 1992). In beiden Fällen wurde zur Spermienkapazitation Kalziumionophor verwendet, welches hierfür, gemessen auch an den Fertilisationsraten in anderen Untersuchungen, am besten geeignet zu sein scheint. Zur Fertilisation werden die Oozyten und die kapazitierten Spermien gemeinsam inkubiert.

BLUE und Mitarbeiter verglichen elf Kapazitationsmethoden und die anschließende Penetrationsfähigkeit der Spermien in Hamsteroozyten ohne Zona pellucida oder tiefgefrorene Pferdeoozyten (Blue et al. 1989). Als Behandlung zur Kapazitation wurden verwendet: 1) 1  $\mu$ M Kalziumionophor A23187, 2) 1  $\mu$ M A23187 + 5 mM Koffein, 3) 10  $\mu$ M Lysophosphatidyl-Serin (LPS), 4) 10  $\mu$ M LPS + 5 mM Koffein, 5) 10  $\mu$ M Liposomen von Phosphatidyl-Cholin (PC12), 6) 10 IU Heparin / ml, 7) 10 IU Heparin / ml + 10  $\mu$ M LPS, 8) 50  $\mu$ M Penicillamin / Hypotaurin / Epinephrin (PHE), 9) 50  $\mu$ M PHE + 10  $\mu$ M LPS, 10) equine präovulatorische Eileiterflüssigkeit 1:1 gelöst in Glukose-freier, modifizierter Tyrodes Lösung (TALP-g) und 11) TALP-g. Alle Stoffe wurden in TALP-g suspendiert,

Kalziumionophor wurde in Glukose- und BSA-freier TALP (TALP-g-BSA) gelöst. Bei den Behandlungen 1 bis 5 wurden die Oozyten gleich nach der Kapazitationsbehandlung, bei Behandlung 6 bis 11 erst fünf Stunden nach der Kapazitation mit den Spermien inkubiert. Pro Versuch wurden  $2 \times 10^6$  Spermien / ml mit zehn Hamster und acht equinen Oozyten inkubiert. Koffein und LPS wurden sofort und 45 min. vor der Zugabe der Oozyten hinzugefügt. Die Inkubation der Hamsteroozyten erfolgte für 3,5 h, Pferdeoozyten wurden für fünf Stunden inkubiert. Die besten Penetrationsraten wurden bei Verwendung von A23187, LPS und PC12 erreicht. Bei einem anschließenden Befruchtungsversuch von 26 *in vivo* gereiften Pferdeoozyten mit Spermien, welche mit A23187 oder LPS behandelt wurden, konnten jedoch nur zwei vermutete Befruchtungen festgestellt werden.

DELCAMPO und Mitarbeiter berichten von einer 15 % Befruchtungsrate von *in vitro* gereiften Pferdeoozyten (DelCampo et al. 1990). Die Spermien wurden dabei zunächst durch einen Percoll Gradienten gewaschen und anschließend entweder mit Koffein oder mit Koffein + A23187 behandelt. Die Inkubation von Oozyten und Spermien erfolgte für 18 h. Dabei konnten die Untersucher keinen Unterschied in der Befruchtungsrate zwischen diesen beiden Behandlungsmethoden feststellen.

PALMER und Mitarbeiter (Palmer et al. 1991) konnten durch die Kapazitation mit Kalziumionophor A23187 eine Befruchtungsrate von 26 % erreichen. Die Spermienbehandlung fand dabei in Hank's HEPES-Lösung mit BSA statt. Die Behandlung mit Heparin oder TALP + Heparin führte dagegen zu keinen Befruchtungen. 18 % dieser befruchteten Oozyten teilten sich, ein lebendes Fohlen konnte nach dem Transfer auf eine Empfängerstute geboren werden. In einem anderen Experiment führte dagegen die Kapazitation mit TALP + 10 µg Heparin + 5 mM Koffein (4 h) oder mit TALP + 0,1 mM A23187 (1 min.) zu fast gleichen Kapazitationsraten ( $26 \pm 7$  % und  $24 \pm 2$  %), eine Befruchtung wurde jedoch nicht durchgeführt. Der Membranstatus der behandelten Spermien wurde dabei durch Färbung mit Chlortetrazyklin untersucht (Ellington et al. 1992). In einem zweiten Experiment derselben Untersucher wurde die Kapazitation mit A23187 und mit zwei konditionierten Medien (Eileiterepithelzellen) verglichen. Die konditionierten TALP-Medien wurden entweder auf einem Monolayer oder in einer Zellsuspension hergestellt. Die Kapazitationsrate war bei den drei Behandlungsmethoden ebenfalls ungefähr gleich ( $25 \pm 5$  % bis  $32 \pm 6$  %). Zudem blieben die Spermien bei der Co-Kultur mit einem Eileiterepithelzell-Monolayer für vier Tage lebensfähig (untersucht durch Färbung mit Hoechst 33258). Die

Befruchtungsraten der Spermien aus der Monolayer-Co-Kultur und der Behandlung mit A23187 zeigten keinen Unterschied.

ALM und Mitarbeiter behandelten frisches Sperma und Tiefgefriersperma entweder mit 200 µg Heparin oder mit 7,14 µM Kalziumionophor (Alm et al. 2001). Insgesamt konnten 28,4 % der verwendeten Oozyten penetriert werden, bei 12,9 % kam es zu einer Befruchtung (männlicher und weiblicher Pronukleus). Dabei gab es zwischen den Sperma- und Behandlungsmethoden keine signifikanten Unterschiede. Die Autoren sind aber der Meinung, daß zur Kapazitation frischer Spermien Kalziumionophor und für die Kapazitation von Tiefgefrierspermien Heparin besser geeignet ist.

FARLIN und Mitarbeiter untersuchten die Kapazitation mit unterschiedlichen Konzentrationen an A23187 und unterschiedlich langer Inkubationszeit (Farlin et al. 1992). Es wurden entweder 1 / 2,5 oder 5 µM A23187 verwendet und für 30 / 60 / 90 oder 120 min. mit den Spermien inkubiert. Dabei zeigte sich, daß sowohl durch eine erhöhte Konzentration als auch durch eine verlängerte Inkubation die Kapazitationsrate erhöht werden kann, gleichzeitig jedoch die Spermienmotilität erniedrigt wird, und der Anteil an Spermien mit einer Akrosomenreaktionen (Fluoreszenzmikroskopie) zunimmt. Kalziumionophor scheint dabei einen Effekt auf die Akrosomen- und Plasmamembranintegrität zu haben. So zeigten behandelte Spermien eine Vesikulierung der Plasma- und äußeren Akrosomenmembran. Zudem konnten fluoreszierende Stoffe an die innere Akrosomenmembran und an Matrixbestandteile gebunden werden. Bei einer Konzentration von 1 µM wurde nach zwei Stunden Inkubation ein maximaler Anteil motiler Spermien mit nur wenigen verfrühten Akrosomenreaktionen erreicht. Die Zugabe von BSA nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit A23187 hat dabei keinen Einfluß auf die Motilität der Spermien oder den Anteil an Akrosomenreaktionen.

Insgesamt sind die Erfolgsraten durch die konventionelle *in vitro*-Fertilisation beim Pferd bisher eher gering. Mit den assistierten Fertilisationstechniken konnten dagegen bessere Ergebnisse erzielt werden.

## 13.2 Assistierte Fertilisationstechniken

Zu den assistierten Fertilisationstechniken kann man die mechanische Manipulation der Zona pellucida, das Zona drilling und die intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) zählen. Die mechanische Manipulation der Zona pellucida wird von CHOI und Mitarbeitern

beschrieben (Choi et al. 1994). In einem ersten Experiment wurden *in vitro* gereifte Oozyten verwendet mit a) intaktem Cumulus, b) ohne Cumulus, aber mit intakter Zona pellucida oder c) ohne Zona pellucida. Die Cumuluszellen wurden mit 0,5 % Hyaluronidase, die Zona pellucida mit 0,1 % Protease entfernt. Die Spermien wurden nach drei Stunden Präinkubation in B0 Medium mit 5 mM Koffein für 60 s mit 0,1  $\mu$ M A23187 kapazitiert. In diesem Versuch lag die Spermienpenetration für Oozyten ohne Zona pellucida bei 83 %, während Oozyten mit intakter Zona pellucida oder mit Cumuluszellen nur eine Penetrationsrate von 1-3 % zeigten. In einem zweiten Experiment wurden ebenfalls *in vitro* gereifte Oozyten verwendet. Diese wurden eine Stunde vor Beendigung der Reifung von ihren Cumuluszellen befreit und dann in einen Tropfen aus 0,3 M Saccharose in PBS + 1 % FBS gegeben. Unter einem Mikroskop wurde mit einem Mikromesser entweder ein Schnitt in die Zona pellucida gesetzt, oder es wurde ein Teil der Zona pellucida entfernt. Eine komplette Entfernung der Zona pellucida wurde mit Hilfe von 0,1% Protease durchgeführt. Nach diesen Eingriffen wurden die Oozyten mit Spermien inkubiert. Die Penetrationsraten betrugen für Zona intakte Oozyten 4 %, für Oozyten mit eingeschnittener Zona 12 %, für Oozyten mit partieller Zonaresektion 52 % und für Zona freie Oozyten 86 %. In einem dritten Experiment wurde nun die Spermienpenetration und die Pronukleusformation bei Oozyten mit partiell entfernter Zona pellucida 2,5 bis 20 h nach der Befruchtung untersucht. Die Spermienpenetration begann 2,5 h nach der Inkubation mit Spermien (22 %) und nahm zu auf 38 % nach fünf Stunden, 46 % nach zehn Stunden und schließlich 56 % nach 20 h. Die Transformation der Spermienköpfe in männliche Vorkerne wurde erst zehn Stunden nach Beginn der Inkubation beobachtet. Die Untersucher schließen aus ihren Ergebnissen, daß diese assistierten Befruchtungstechniken nützlich sein könnten bei der *in vitro*-Produktion von Embryonen.

Beim Zona drilling wird mit Hilfe eines feinen Mediumstrahls einer sehr sauren Lösung ein kleines Loch in der Zona pellucida erzeugt. Nach diesem Eingriff werden Befruchtungsraten von 79 % gegenüber 0-33 % der Kontrollgruppe angegeben, wobei sich 18 % der behandelten Oozyten bis zum Blastozystenstadium weiter entwickelten. Es wurden jedoch keine Embryonen übertragen. Die Behandlung der Spermien wurde mit Kalziumionophor durchgeführt (Li et al. 1995).

Bei der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ISCI) wird eine Oozyte gewonnen, gereift und dann vollständig von ihren Cumuluszellen befreit. Es werden nur Oozyten mit einem ausgeschleusten Polkörperchen verwendet. Das frische oder tiefgefrorene Sperma wird gewaschen und dann in ein Medium mit PVP (Polyvinylpyrrolidon) überführt. Üblicherweise wird der Spermischwanz entfernt (Squires et al. 2003), oder der



Spermenschwanz wird zur Immobilisation und zur Zerstörung der Plasmamembran der Spermien auf den Boden der Petrischale gedrückt. Dies ist wichtig, um spermeneigene Faktoren zu entlassen, welche die Oozyte aktivieren (Dozortsev et al. 1995; Choi et al. 2002). Das Spermium wird dann in die Oozyte injiziert, welche eventuell noch chemisch aktiviert werden kann. Dann erfolgt entweder der Transfer in den Eileiter einer Empfängerstute oder eine Kultur *in vitro*. Probleme bei der Spermienbindung an die Zona pellucida und Spermienpenetration können so durch die direkte Injektion umgangen werden (Squires et al. 2003). So konnten durch die ICSI schon mehrere lebende Fohlen geboren werden (Cochran et al. 1998; McKinnon et al. 2000). Die Befruchtungsraten werden nach ICSI mit 30-52 % angegeben (Dell'Aquila et al. 1997).

DELL'AQUILA und Mitarbeiter verglichen die Entwicklungsraten nach Standard IVF und ICSI (Dell'Aquila et al. 1997). Die aus Ovarien von Schlachttieren gewonnenen Oozyten wurden für 27 bis 30 h *in vitro* gereift. Für die IVF wurden die Cumuluszellen durch Pipettieren weitgehend entfernt, für die ICSI erfolgte eine komplette Entfernung der Cumuluszellen mit Hyaluronsäure. Die Vorbereitung des Tiefgefrierspermas erfolgte für die IVF durch swim-up Technik in modifiziertem Tyrode-Laktat-Medium, für die ICSI durch swim-up Technik in Earle's Balanced Salt Solution. Die Inkubation der Spermien und Oozyten erfolgte für 24 h bei 38,5°C. Die ICSI wurde in einem Tropfen HEPES-gepufferter menschlicher Eileiterflüssigkeit mit 10 % PVP durchgeführt. Weniger als 1 µl der Spermien suspension ( $0,5-1 \times 10^7$  Spermien / ml) wurde dem PVP Tropfen zugefügt. Die konventionell oder durch ICSI befruchteten Oozyten wurden anschließend für 18-20 h in Tyrodes-Lösung bei 38,5°C mit 5 % CO<sub>2</sub>-Anteil kultiviert. Die ICSI ergab mit 29,8 % deutlich bessere Befruchtungsraten als die IVF mit 8,7 %. Dabei waren die Ergebnisse besser bei Oozyten mit expandiertem Cumulus (ICSI: 52,2 %, IVF: 17,1 %) im Vergleich zu Oozyten mit kompaktem Cumulus (ICSI: 14,7 %, IVF: 4,4 %).

Andere Untersucher konnten nach der Kultur von vier injizierten Oozyten für 3,5 Tage in Menezo's B2 Medium + 10 % Neugeborenen-Kälberserum einen Embryo im 10-12 Zellstadium gewinnen. Nach Übertragung in den Eileiter einer Empfängerstute konnte eine Trächtigkeit etabliert werden (Squires et al. 1996). In einer weiteren Untersuchung an der Colorado State Universität wurde die Aktivierung der Oozyten nach ICSI mit Kalziumionophor A23187 getestet (Kato et al. 1997). Nach der ICSI wurden die Oozyten in zwei Gruppen geteilt: Gruppe 1 wurde für fünf Minuten mit 10 µM A23187 behandelt, während Gruppe 2 unbehandelt blieb. Nach zwei Tagen Kultur *in vitro* war die Teilungsrate bei den aktivierten Oozyten mit 21 % deutlich höher als bei der unbehandelten Gruppe mit

5 %. Auch LI und Mitarbeiter führten eine Untersuchung zur Aktivierung der Oozyten nach ICSI durch (Li et al. 2000). Sie verglichen die vier Substanzen Ionomycin, Ethanol, Thimerosol und Inositol. Dabei erhöhte die Verwendung von Thimerosol deutlich den Anteil aktivierter Oozyten und die Teilungsrate zum 2-Zell-Stadium war mit 48 % deutlich höher als bei der Kontrollgruppe (0 %). Die Behandlung mit Thimerosol führt zu einem wiederholten Kalziumanstieg, was für die Aktivierung der Oozyten notwendig sein könnte.

Die Entwicklung von durch ICSI befruchteten Oozyten *in vitro* und *in vivo* wurde von GRONDAHL und Mitarbeitern untersucht (Grondahl et al. 1997). Alle Oozyten wurden nach der ICSI zunächst für mindestens zehn Stunden *in vitro* in Menezo's B2 Medium mit 5 % Serumzusatz kultiviert und dann entweder 1) sofortige Fixation oder weitere *in vitro*-Kultur für insgesamt 20 oder 72 h, 2) *in vitro*-Kultur für vier bis fünf Stunden, danach Übertragung in die Eileiter pseudogravider Mäuse, oder 3) *in vitro*-Kultur für vier bis fünf Stunden, danach Übertragung in synchronisierte Empfängerstuten. Nach 72 h wurden die übertragenen Oozyten wieder gewonnen. Alle Oozyten wurden fixiert und teilweise gefärbt und dann licht- und elektronenmikroskopisch untersucht. Zwanzig Stunden post injectionem wurden bei sechs von 12 injizierten Oozyten zwei Pronuklei festgestellt. Die Teilungsrate *in vitro* betrug nach 72 h 16 %, der am weitesten entwickelte Embryo befand sich im 6-bis 8-Zell-Stadium. Die Teilungsrate *in vivo* war nur sehr gering, nur eine von zehn Oozyten hatte sich geteilt und befand sich im 2-Zell-Stadium.

COCHRAN und Mitarbeiter berichten von zwei lebend geborenen Fohlen nach ICSI (Cochran et al. 1998). Die Oozyten wurden durch transvaginale Follikelpunktion von frühträchtigen Stuten gewonnen und *in vitro* gereift. Nach ICSI erfolgte eine Kultur in TCM 199 oder P-1 Medium (Glukose- und Phosphat-frei) mit 15 % FCS für 48 h. Die Teilungsraten betrugen für die zwei Medien 47 % und 63 %. Diese Ergebnisse stimmen mit Veröffentlichungen überein, welche einen schädlichen Einfluß hoher Konzentrationen an Glukose auf die Entwicklung von frühen Mäuse- (Chatot et al. 1989), Rinder- (Ellington et al. 1990), Hamster- (Seshagiri und Bavister 1989) und menschlicher Embryonen (Fitzgerald und DiMattina 1992) berichten. Vier Embryonen wurden in die Eileiter von vier Empfängerstuten übertragen. Es konnten drei Trächtigkeiten etabliert werden, zwei Fohlen wurden ausgetragen. Von zwei weiteren lebend geborenen Fohlen berichten MC KINNON und Mitarbeiter (McKinnon et al. 2000). Sie verwendeten *in vivo* gereifte Oozyten und Tiefgefriersperma eines fertilen und eines infertilen Hengstes. Nach der ICSI wurden die Oozyten entweder sofort in die Eileiter von Empfängerstuten übertragen oder erst nach 24 bis 48 h Kultur *in vitro*. Insgesamt wurden 26 Oozyten verwendet, wovon drei (12 %) nach der Injektion

degenerierten. Acht Oozyten wurden sofort übertragen, wobei drei Trächtigkeiten etabliert werden konnten. Von den 15 kultivierten Oozyten zeigten acht (53 %) zwei Polkörperchen und teilten sich nach 24 h bis zum 2-Zell-Stadium. Von acht übertragenen Embryonen konnte eine Trächtigkeit etabliert werden. Zwei der Stuten abortierten noch im ersten Monat. Die Herkunft des Spermas (fertiler / infertiler Hengst) hatte keinen Einfluß auf die Etablierung einer Trächtigkeit.

Auch LAZZARI und Mitarbeiter führten die ICSI mit Tiefgefriersperma mehrerer Hengste unterschiedlicher Fertilität durch (Lazzari et al. 2002). Das Sperma wurde dabei nach dem Auftauen bezüglich der Spermienmotilität und den Trächtigkeitsraten der Spermienspender in vier Gruppen unterteilt: A) über 30 % vorwärtsbewegliche Spermien + Trächtigkeitsrate über 40 %, B) über 30 % vorwärtsbewegliche Spermien + keine Trächtigkeiten, C) 10 – 30 % vorwärtsbewegliche Spermien + Trächtigkeitsrate unter 20 % und D) unter 10 % vorwärtsbewegliche Spermien + keine Trächtigkeiten. Die Oozyten wurden durch Ausschabung aus Schlachthofovarien gewonnen und *in vitro* gereift. Allen Oozyten wurden motile Spermien injiziert mit Ausnahme der Spermien der Gruppe D. In dieser Gruppe konnten nach der Verdünnung des Spermas mit PVP keine motilen Spermien mehr gefunden werden. Nach der ICSI wurden die Oozyten zwei Tage *in vitro* kultiviert und dann chirurgisch in die Eileiter von Schafen übertragen. Diese wurden unabhängig vom Zyklusstand am Tag des Transfers mit einem intravaginalen Progesteronschwämmchen behandelt. Am Tag 7 nach der ICSI wurden die Embryonen wieder gewonnen, vier Embryonen aus der Gruppe B wurden nicht-chirurgisch in Paaren auf zwei Empfängerstuten übertragen. Die Teilungs- und Entwicklungsraten zu Morulae oder Blastozysten waren für Spermien der Gruppen A, B und C nahezu gleich. In Gruppe D gab es hingegen eine deutlich geringere Teilungsrate und es entwickelten sich keine Embryonen (siehe Tabelle 24). Aus den vier übertragenen Embryonen entstanden zwei Zwillingsträchtigkeiten. Diese Studie zeigt, daß sich motile Spermien fertiler und infertiler Hengste zur ICSI eignen. Allerdings zeigte sich auch, daß die Entwicklungsrate der befruchteten Oozyten nicht mit dem Befruchtungsvermögen der verschiedenen Hengste korreliert. Die ICSI *in vitro* gereifter Oozyten eignet sich demnach nicht als Test, um die Fertilität von Tiefgefriersperma in der Praxis vorherzusagen.

**Tabelle 24:** Teilungs- und Entwicklungsraten nach ICSI mit Tiefgefriersperma unterschiedlicher Motilität und Fertilität nach LAZZARI (Lazzari et al. 2002)

Hengstgruppe	Anzahl injizierter Oozyten	Anzahl geteilter Oozyten	Teilungsrate %	Anzahl Morulae/ Blastozysten	% Morulae+ Blastozysten / geteilter Oozyten
<b>A</b>	117	88	75,2 <sup>a</sup>	42	47,7 <sup>a</sup>
<b>B</b>	78	49	62,8 <sup>a</sup>	21	42,9 <sup>a</sup>
<b>C</b>	91	72	79,1 <sup>a</sup>	33	45,8 <sup>a</sup>
<b>D</b>	46	4	8,7 <sup>b</sup>	0	0,0 <sup>b</sup>

Chi-Quadrat Test. Zahlen innerhalb der Spalten mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ( $P < 0,05$ ).

Oozyten, welche *in vitro* mit Eileiterepithelzellen oder mit fetalen Fibroblastzellen gereift wurden, scheinen sich besser zur ICSI zu eignen als Oozyten in zellfreien Reifungsmedien (Li et al. 2001). Die Oozyten wurden von Schlachthofovarien gewonnen und für 28–30 h in TCM-199 entweder ohne Zusatz von Zellen, mit Eileiterepithelzellen oder mit fetalen Fibroblastzellen gereift. Der Anteil gereifter Oozyten (Metaphase II) war in den drei Kultursystemen annähernd gleich (49, 53 und 51 %). Auch die Teilungsraten der drei Gruppen war nach ICSI vergleichbar (63, 65 und 57 %). Allerdings war der Anteil an 2-Zell-Embryonen, welche sich zu Blastozysten weiter entwickelten, höher bei Oozyten, welche mit Eileiterepithelzellen oder fetalen Fibroblastzellen gereift wurden (17 % gegenüber 0 %). Für die Embryokultur wurde Dulbecco's modified Eagle's Medium mit oder ohne Cumuluszell-Monolayer verwendet. Sechs der Blastozysten (Oozyten in Co-Kultur mit Eileiterepithelzellen) wurden in den Uterus von Empfängerstuten übertragen, zwei Fohlen wurden geboren und eine Stute war zum Zeitpunkt der Veröffentlichung noch trächtig.

Auch die Art der Oozytengewinnung kann Einfluß auf die Ergebnisse der ICSI haben (Dell'Aquila et al. 2001). Dabei gab es zwischen Oozyten, welche durch Aspiration oder durch die Ausschabung der Follikel gewonnen wurden, keine Unterschiede in der Rate der Pronukleusformation (68,5 % nach Aspiration, 52,6 % nach scraping). Der Anteil abnormer Befruchtungen lag jedoch bei durch Aspiration gewonnenen Oozyten mit 19 % deutlich höher als bei den durch Ausschabung gewonnenen Oozyten mit nur 6 %. So kann die Art der Oozytengewinnung auch zu unterschiedlichen Ergebnissen der ICSI bei den verschiedenen Untersuchern beitragen. Die Verwendung von frischen Spermien oder Tiefgefrierspermien scheint dagegen keinen Unterschied in der Befruchtungsrates zu bedingen (Choi et al. 2002).

Die Autoren verwendeten *in vitro* gereifte Oozyten, die Spermien wurden mit der swim-up Technik präpariert. Die Immobilisation der Spermien und deren Übertragung in die Oozyten wurde hierbei mit Hilfe eines „Piezo-Mikromanipulators“ durchgeführt. Das Piezo-System produziert mechanische Impulse, die sich entlang der Pipette zur Pipettenspitze fortbewegen, welche dadurch vibriert. Die Vibrationen der Spitze unterstützen die Punktion der Zona pellucida und des Oolemm. Die injizierten Oozyten wurden in G1.2 Medium für 20 oder 96 h kultiviert oder in den Eileiter von Empfängerstuten übertragen und 96 h später wieder gewonnen. Die Fertilisationsrate 20 h nach ICSI zeigte zwischen frischen und tiefgefrorenen Spermien keinen deutlichen Unterschied (24 gegenüber 17 %). Auch im Bezug auf die Teilungs- bzw. Embryoentwicklungssrate konnte man keine signifikanten Unterschiede feststellen. Die *in vitro*-Kultur in G1.2 Medium (synthetische Eileiterflüssigkeit mit geringem Glukoseanteil) führte zu gleichen Teilungsraten, die Zellzahl war jedoch verglichen mit den *in vivo* kultivierten Zygoten geringer. Eine chemische Aktivierung der Oozyten scheint nicht notwendig zu sein. Die Autoren vermuten, daß dies auch mit der Methode des Piezo-Mikromanipulators zusammenhängen könnte, wobei im Gegensatz zur konventionellen ICSI die Permeabilität der Spermienmembran durch piezoelektrische Impulse erhöht wird. Auch das Oolemm scheint zuverlässig durchdrungen zu werden, so daß sich das Spermium auch tatsächlich im Zytoplasma befindet (Choi et al. 2002). Diese Methode scheint für die Oozyten weniger traumatisch zu sein als die konventionelle Methode der ICSI, da nur eine minimale Verformung der Zelle stattfindet. Beim Einführen der Pipette in eine Oozyte wird das Oolemm zunächst durch den einwirkenden Druck komprimiert. Werden bei tief eingeführter Pipette einige piezoelektrische Impulse abgegeben, wird das Oolemm durchstoßen und es beginnt sich wieder auszudehnen, bis die ursprüngliche Form nach Entfernung der Pipette wieder erreicht ist. Bei hohen Temperaturen (25-37°C) erfolgte die Wiederausdehnung schnell und viele Oozyten degenerierten. Bei niedrigeren Temperaturen (17-18°C) fand der Ausdehnungsprozeß (eventuell durch eine Erhöhung der Viskosität des Ooplasmas) langsamer statt. Diese langsame Ausdehnung scheint den durch die Pipette entstandenen Kanal im Oolemm für eine gewisse Zeit verschlossen zu halten, so daß ein Einfließen von Medium in die Oozyte verhindert wurde. Das punktierte Ooplasma scheint sich während dieser Zeit wieder zu schließen (Kimura und Yanagimachi 1995).

Auch GALLI und Mitarbeiter arbeiteten unter Verwendung von piezoelektrischen Impulsen zur Immobilisation der Spermien (Galli et al. 2002). Die Oozyten wurden durch transvaginale Follikelpunktion gewonnen und *in vitro* gereift, die Spermien waren zuvor tiefgefroren. Nach der ICSI erfolgte eine *in vitro*-Kultur der Oozyten für zwei Tage. Dann

wurde ein Teil der befruchteten Oozyten chirurgisch in die Eileiter von Schafen übertragen, die anderen Oozyten reiften weiter *in vitro*. Die Schafe wurden unabhängig vom Zyklusstand verwendet und am Tag des Transfers mit einem intravaginalen Progesteronschwämmchen versorgt. Nach sieben Tagen wurden die Embryonen wieder gewonnen. Einige Embryonen guter Qualität wurden eingefroren, bevor sie chirurgisch oder nicht-chirurgisch auf Empfängerstuten übertragen wurden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von GRONDAHL und Mitarbeitern (Grondahl et al. 1997) schien die Entwicklung der Embryonen *in vivo* effektiver zu sein als jene *in vitro*. So entwickelten sich 56 % der in Schafeileiter übertragenen Embryonen zu Morulae oder Blastozysten, während dies *in vitro* nur bei 20 % der Fall war. Von den 12 übertragenen Embryonen entwickelte sich eine Einlings- und eine Zwillingssträchtigkeit.

### 13.3    **Schlußfolgerung**

Die Befruchtung *in vitro* kann durch die Standardtechniken der IVF oder mit assistierten Fertilisationstechniken wie mechanische Manipulation der Zona pellucida, Zona drilling und der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion durchgeführt werden, jedoch wird beim Pferd bisher keine dieser Techniken routinemäßig angewandt. Die Fertilisationsraten liegen bei der ICSI mit ca. 50 % höher als bei der Standard-IVF (bis zu 26 %). Beide Techniken haben nach dem Transfer auf Empfängerstuten zu lebenden Fohlen geführt. Zur Kapazitation der Spermien wird in den meisten Fällen Kalziumionophor eingesetzt. Die ICSI kann mit einem konventionellen Mikromanipulator oder mit einem Piezo-Mikromanipulator durchgeführt werden. Motile Spermien fertiler und infertiler Hengste sind dabei gleichsam zur ICSI geeignet, auch bei der Verwendung von frischen und tiefgefrorenen Spermien konnte kein Unterschied in der Befruchtungsrate festgestellt werden. Zur Reifung der befruchteten Oozyten bis zum Morula- oder Blastozystenstadium ist sowohl die Kultur *in vitro* als auch *in vivo* geeignet.

## 14. *In vitro*-Kultur von Embryonen

In einem *in vitro*-Fertilisationsprogramm wäre ein Kultursystem zur Embryoentwicklung bis zum Blastozystenstadium von Vorteil, da diese nicht-chirurgisch in den Uterus der Empfängerstuten übertragen werden können. Viele Studien, die bisher zur *in vitro*-Entwicklung durchgeführt wurden, verwendeten jedoch keine *in vitro* produzierten, sondern *in vivo* gewonnene Embryonen (Hinrichs 1998). Frühe Entwicklungsstadien von Embryonen verschiedener Säugetierspezies erfahren bei der *in vitro*-Kultur zu unterschiedlichen Zeitpunkten eine Blockade der Entwicklung (Bavister 1988). WEBER und Mitarbeiter (Weber et al. 1990) vermuten, daß die Blockade auch Pferdeembryonen betrifft, da sich nur einer von sieben Embryonen vom 2-bis 8-Zell-Stadium *in vitro* zur Blastozyste weiter entwickelte (Defined Medium). Dagegen erreichten sechs von sieben Embryonen, die mit Eileiter- oder Uterusgewebe co-kultiviert wurden, das Blastozystenstadium.

### 14.1 *In vitro*-Kultur von *in vivo* produzierten Embryonen

BALL und Mitarbeiter (Ball et al. 1991) kultivierten 2 Tage post ovulationem chirurgisch gewonnene Embryonen im 4-bis 8-Zell-Stadium mit Eileitergewebe oder mit Trophoblastzellen. Als Medium wurde Ham's F 10 + Dulbecco's Modified Eagle's Medium (50:50) verwendet. Die Kultur fand für vier Tage bei 38,5°C und 5 %iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre statt. Dann wurden die Embryonen mit Hoechst 33342 gefärbt, um die vorhandene Zellzahl zu ermitteln. Als Vergleich wurden sechs Tage post ovulationem gewonnene Embryonen herangezogen. Während drei von sieben mit Eileitergewebe co-kultivierten Embryonen das Blastozystenstadium erreichten, konnte sich keiner der sieben mit Trophoblastzellen kultivierten Embryonen bis zu diesem Stadium weiter entwickeln. Die gezählte Zellzahl war für die mit Eileitergewebe kultivierten Embryonen größer als für die mit Trophoblastzellen kultivierten ( $162,6 \pm 32$  gegenüber  $87,3 \pm 28$ ). Die Zellzahl der *in vivo* gereiften Kontrollembryonen lag jedoch mit 378, 399 und über 1000 weit über den *in vitro* kultivierten Embryonen.

BATTUT und Mitarbeiter (Battut et al. 1991) verglichen die Entwicklung von zwei Tage post ovulationem chirurgisch gewonnenen Embryonen im 2-bis 8-Zellstadium in B2 Medium + 15 % FCS mit oder ohne Eileiterzell-Monolayer (jeweils fünf Embryonen). Von

den ohne Monolayer kultivierten Embryonen wurde die Entwicklung bei drei von fünf im 12- bis 20-Zell-Stadium und bei einem im Stadium der Morula blockiert. Diese Embryonen zeigten bei der mikroskopischen Untersuchung Anzeichen der Degeneration (Lysis der Membranen und verstreutes Zellmaterial). Nach vier Tagen Kultur hatten drei Embryonen das Blastozystenstadium erreicht. Davon waren zwei Embryonen mit und einer ohne Monolayer kultiviert worden. Allerdings scheinen sich die *in vitro* entwickelten Embryonen von den *in vivo* entwickelten zu unterscheiden: es war nur eine dünne Zona pellucida und keine Kapsel vorhanden. Das Wachstum und die Entwicklung der Blastozysten scheint verzögert zu sein. Diese Beobachtung wurde auch in anderen Untersuchungen gemacht (Ball et al. 1991; Ball und Miller 1992).

Die Übertragung von *in vitro* kultivierten Embryonen (Co-Kultur mit Eileiterepithelzellen) und aus dem Uterus gewonnenen, sieben Tage alten Embryonen auf Empfängerstuten kann anscheinend zu vergleichbaren Trächtigkeitsraten führen (Tag 30 der Gestation) (Ball und Miller 1992). Die Embryonen zur *in vitro*-Kultur wurden chirurgisch am Tag 2 post ovulationem im 4-bis 8-Zell-Stadium gewonnen. Als Kulturmedium wurde Ham's F10 + Dulbecco's Modified Eagle's Medium (50:50) mit oder ohne (Kontrollembryonen) Eileiterepithelzellen verwendet. Alle ohne Eileiterepithelzellen kultivierten Embryonen waren nach sieben Tagen Kultur degeneriert. Von den co-kultivierten Embryonen entwickelten sich nach fünf bis sieben Tagen Kultur 14 von 15 zu Blastozysten. Allerdings nahm die Qualität der Embryonen mit zunehmender Entwicklung ab. Auch in dieser Untersuchung zeigte sich ein verzögertes Wachstum und eine verzögerte Entwicklung gegenüber den aus dem Uterus gewonnenen Embryonen. Die Entwicklung der Embryonen nach der Übertragung verlief jedoch physiologisch. So konnten sich nach dem Transfer von acht *in vitro* gereiften Oozyten drei Trächtigkeiten etablieren (Tag 30 der Gestation), der Transfer von acht aus dem Uterus gewonnenen Embryonen führte zu fünf Trächtigkeiten.

In einer anderen Untersuchung verglichen BALL und Mitarbeiter (Ball et al. 1993) die *in vitro*-Kultur von einem oder zwei Tage post ovulationem gewonnenen Embryonen. Diese befanden sich zum Zeitpunkt der Gewinnung im 1-bis 2-Zell-Stadium (ein Tag post ovulationem) bzw. im 4-bis 8-Zell-Stadium (zwei Tage post ovulationem). Als Kulturmedium wurde wiederum Ham's F 10 + Dulbecco's Modified Eagle's Medium (50:50) mit oder ohne Eileiterepithelzellen verwendet. Insgesamt haben sich 35 % der co-kultivierten Embryonen bis zur Blastozyste weiter entwickelt, wohingegen dies bei keinem der Embryonen ohne Co-Kultur der Fall war. Innerhalb der co-kultivierten Gruppe konnten sich deutlich weniger Embryonen vom 1-bis 2-Zell-Stadium zur Blastozyste entwickeln (35 %) als vom 4-bis 8-



Zell-Stadium (89 %). Die Entwicklungsdauer betrug dabei für die 1-bis 2-Zell-Embryonen ca. einen Tag länger als für die 4-bis 8-Zell-Embryonen (sieben bis acht Tage gegenüber sechs bis sieben). Aus bisher noch ungeklärten Gründen zeigten die Blastozysten, die sich aus den 1-bis 2-Zell-Embryonen entwickelten, eine bessere Qualität und einen höheren Mitoseindex als jene aus 4-bis 8-Zell-Embryonen. Allersdings wurden keine Embryonen auf Empfängerstuten übertragen, so daß über das Entwicklungsvermögen dieser Embryonen keine Aussage gemacht werden konnte.

BRINSKO und Mitarbeiter (Brinsko et al. 1994) verglichen junge, fertile Stuten und ältere, subfertile Stuten als Spender für zwei Tage alte Embryonen und für Eileiterepithelzellen zur Co-Kultur. Die Embryonen wurden für sieben Tage bei 38.5°C und 5 % CO<sub>2</sub> –Anteil kultiviert. Dabei konnte man keinen Unterschied in der Entwicklung zum Blastozystenstadium bei der Verwendung von Eileiterepithelzellen junger oder älterer Stuten erkennen. Die Entwicklung zum Blastozystenstadium war vergleichbar zwischen den Embryonen junger und älterer Stuten. Allerdings zeigte sich bei den Blastozysten älterer Stuten eine Verminderung der Zellzahl, der Qualität und des Durchmessers nach sieben Tagen Kultur *in vitro*.

## **14.2    *In vitro*-Kultur von *in vitro* produzierten Embryonen**

Der Einfluß der Glukosekonzentration im Kulturmedium auf die frühe Embryonalentwicklung wurde von AZUMA und Mitarbeitern (Azuma et al. 1995) untersucht. Dabei wurden, anders als in den bisherigen Untersuchungen, *in vitro* gereifte und *in vitro* fertilisierte Oozyten verwendet. In einem ersten Experiment verwendete man als Kulturmedien entweder modifizierte synthetische Eileiterflüssigkeit (ohne Glukose) oder TCM 199. Zugesezt wurde beiden Medien entweder 10 % FBS oder 0,1 % Polyvinylalkohol (PVA). Die Embryonen wurden für acht Tage bei 38,5°C mit 5 % CO<sub>2</sub>-Anteil kultiviert. In keinem der vier verwendeten Kulturmedien entwickelte sich ein Embryo weiter als zum 50-Zell-Stadium (Morula), wobei sich nur zwei Embryonen überhaupt über das 8-Zell-Stadium hinaus entwickelten (Beurteilung nach Giemsa-Färbung mit einem Phasenkontrast-Mikroskop). In einem zweiten Experiment wurde die Kultur in modifizierter synthetischer Eileiterflüssigkeit mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen für die ersten vier Kulturtage und die Kulturtage 5 bis 8 unter denselben Kulturbedingungen getestet.

## Versuchsanordnung: Glukosekonzentration in mM

Gruppe	Kulturtag 1 - 4	Kulturtag 5 - 8
1	0 mM	0 mM
2	0 mM	0,5 mM
3	0 mM	5 mM
4	0,5 mM	5,5 mM
5	5,5 mM	5,5 mM

Embryonen aus Gruppe 1 und 5 entwickelten sich kaum über das 8-Zell-Stadium hinaus (nur 17,6 % bzw. 23,1 % hatten mehr als acht Zellen). Die beste Embryoentwicklung fand in Gruppe 4 statt: 21,8 % wuchsen bis zum 8-bis 16-Zell-Stadium, 20 % bis zum 17-bis 50-Zell-Stadium und 9,1 % zeigten mehr als 50 Zellen (Morula). Insgesamt zeigten somit 50,9 % der Embryonen dieser Gruppe mehr als acht Blastomeren. COCHRAN und Mitarbeiter (Cochran et al. 1998) berichten von besseren Teilungsraten nach ICSI und 48 Stunden Kultur bei der Verwendung Glukose-freien Mediums (63 % gegenüber 47 % bei Kultur in TCM 199). Auch bei anderen Spezies wurde über den schädlichen Einfluß hoher Glukosekonzentrationen auf die frühe Embryonalentwicklung berichtet (Chatot et al. 1989; Seshagiri und Bavister 1989; Ellington et al. 1990; Fitzgerald und DiMattina 1992).

In den letzten Jahren konnten durch die Befruchtungserfolge mit der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion vermehrt *in vitro* fertilisierte Oozyten für Versuche zur *in vitro* Kultur eingesetzt werden. Die Kultivierung von Zygoten (Grondahl et al. 1997) für 72 h in Menezo's B2 Medium + 5 % Serumzusatz führte bis zum 6-bis 8-Zell-Stadium. COCHRAN und Mitarbeiter (Cochran et al. 1998) übertrugen vier durch ICSI befruchtete Oozyten (Embryonen mit Qualitätsgrad 1) nach 48 h Kultur (38°C, 5 % CO<sub>2</sub>) in TCM 199 oder P-1 Medium (Glukose- und Phosphat-frei) chirurgisch in die Eileiter von vier Empfängerstuten. Zwei Fohlen wurden geboren. Von einem erfolgreichen intrauterinen Transfer *in vitro* kultivierter Embryonen, welche aus *in vitro* gereiften Oozyten durch ICSI entstanden waren, berichten auch LI und Mitarbeiter (Li et al. 2001). Als Embryokulturmedium wurde Dulbecco's Modified Eagle's Medium mit einem Cumuluszell-Monolayer verwendet. Die Kulturdauer betrug sechs bis acht Tage bei 38°C und 5 % CO<sub>2</sub>-Anteil. Von sechs übertragenen Blastozysten konnten vier Trächtigkeiten etabliert werden, zwei lebende Fohlen wurden geboren. GALLI und Mitarbeiter verglichen die Embryokultur nach ICSI *in vitro* und *in vivo* (Galli et al. 2002). Es wurden *in vitro* gereifte Oozyten

verwendet, welche nach der Spermieninjektion entweder in synthetischer Eileiterflüssigkeit kultiviert oder nach Einbettung in Agar für sieben Tage in die Eileiter von Schafen übertragen wurden. Die Entwicklungsrate zum Morula- oder Blastozystenstadium scheint für *ex vivo* gewonnene Embryonen besser zu sein (38,3 % gegenüber 10,2 % nach *in vitro* Kultur). Zwei *in vitro* kultivierte Embryonen wurden nicht-chirurgisch in den Uterus einer Empfängerstute übertragen, eine Zwillingsträchtigkeit konnte etabliert werden. Von zehn in Schafeileitern kultivierten Embryonen konnten nach Transfer zwei Trächtigkeiten etabliert werden.

### 14.3    **Schlußfolgerung**

Die *in vitro*-Kultur von Embryonen bis zum Morula- oder Blastozysten-Stadium würde vor allem bei *in vitro*-Fertilisationsprogrammen große Vorteile bieten. Zwei lebende Fohlen wurden geboren aus der *in vitro*-Kultur von Embryonen, welche aus *in vitro* gereiften Oozyten und intrazytoplasmatischer Spermieninjektion entstanden waren. Zur Kultur der Embryonen können verschiedene Medien verwendet werden. Wichtig ist jedoch die Co-Kultur mit somatischen Zellen, durch die eine Blockade der Embryoentwicklung *in vitro* weitgehend verhindert werden kann. Auch die Glukosekonzentration im Kulturmedium muß beachtet werden, da hohe Konzentrationen anscheinend auch beim Pferd einen schädlichen Einfluß auf die frühe Embryonalentwicklung haben.

## 15. Zusammenfassung

Bei der Stute ist die praktische Anwendung von Biotechniken in der Reproduktion bisher sehr begrenzt. Der Embryotransfer wird nur in einigen Ländern in geringem Umfang durchgeführt. Eine wesentliche Ursache hierfür ist, daß die klassische Indikation für den Embryotransfer, die Multiplikation des Genpotentials bestimmter Stuten, beim Pferd aufgrund der fehlenden Möglichkeit zur Auslösung von Superovulationen nicht im Vordergrund steht. Aus diesem Grund werden die meisten Stuten während eines Embryotransferprogrammes derzeit nicht stimuliert und die Versuche beschränken sich auf die Gewinnung von Embryonen aus spontanen Ovulationen.

Vor der Übertragung eines Embryos ist es notwendig, den Zyklus von Spender- und Empfängerstute zu synchronisieren. Als zyklussynchron werden Empfängerstuten bezeichnet, die in einem Zeitraum von einem Tag vor bis drei Tage nach der Spenderstute ovulieren. Auch hormonbehandelte, ovariectomierte und mit Progestagenen behandelte Stuten können als Empfängertiere eingesetzt werden. Als Spendertiere eignen sich am besten ausgewachsene Stuten mit gesundem Reproduktionstrakt. Die Embryogewinnungsrate kann bei diesen Stuten bis zu 90 % erreichen. Bei älteren, subfertilen Stuten beträgt die Embryogewinnungsrate dagegen nur zwischen 20 und 40 %.

Die transvaginale Spülung des gesamten Uterus ist heute die Methode der Wahl zur Gewinnung der Embryonen (nicht-chirurgische Gewinnung). Der frühest mögliche Zeitpunkt für die nicht-chirurgische Embryogewinnung ist der 6. Tag post ovulationem. Der Transfer auf die Empfängerstuten kann entweder chirurgisch von der Flanke aus oder nicht-chirurgisch (transzervikal) erfolgen. Mit der chirurgischen Methode können Trächtigkeitsraten bis zu 80 % erreicht werden, weshalb sie beim kommerziellen Transfer hauptsächlich eingesetzt wird. Die Vorteile des nicht-chirurgischen Transfers sind die geringere Invasivität und die niedrigeren Kosten, Nachteil ist die größere Variation der Trächtigkeitsraten.

Die Kühlung und der Transport der Embryonen bietet viele Vorteile bezüglich des Managements eines Transferprogrammes. Die gekühlte Lagerung für 24 bis 30 Stunden scheint die Lebensfähigkeit der Embryonen nicht oder nur geringfügig zu beeinflussen. Die Kryokonservierung von Pferdeembryonen kann entweder mit der konventionellen Methode oder mit der Vitrifikation durchgeführt werden. Kleinere Embryonen überleben die Kryokonservierung besser als große Embryonen. Mikrochirurgische Eingriffe an

Pferdeembryonen können zur Produktion monozygoter Zwillinge und zum Sexing der Embryonen eingesetzt werden.

Die Erzeugung von Embryonen durch extrakorporale Befruchtung hat beim Pferd bisher nur geringe Effizienz. Die Gewinnung von Oozyten kann auf vier verschiedene Arten erfolgen: chirurgisch, durch Follikelpunktion von der Flanke aus, durch transvaginale Follikelpunktion und aus Ovarien von Schlachttieren. Die *in vitro*-Reifung der Pferdeoozyten ist in verschiedenen Kulturmedien möglich. Nach 30 stündiger Kultur in TCM 199 erreichen bis zu 80 % der Oozyten die Metaphase II. Eine Befruchtung der Oozyten *in vivo* kann durch den chirurgischen Transfer in den Eileiter, durch den Gamete Intrafallopian Tube Transfer (GIFT) und durch intrafollikulären Transfer stattfinden. Während beim GIFT auch die Spermien in den Eileiter übertragen werden, erfolgt die Besamung bei den anderen Methoden intrauterin. Der Vorteil des GIFT ist, daß nur geringe Spermienzahlen notwendig sind, weshalb sich diese Methode besonders für subfertile Hengste, Tiefgefriersperma oder gesextes Sperma eignet. Die Kryokonservierung der Oozyten ist ebenfalls durch die konventionelle Methode oder durch Vitrifikation möglich. Tiefgefrorene Oozyten zeigen eine geringere Reifungsrate als ungefrorene Oozyten, die Befruchtungsraten nach IVF waren jedoch vergleichbar. Dagegen scheint die Embryoentwicklungsrate von kryokonservierten Oozyten beeinträchtigt zu sein.

Die *in vitro*-Fertilisation gereifter Oozyten kann durch die Co-Inkubation mit Sperma oder durch assistierte Fertilisationstechniken wie mechanische Manipulation der Zona pellucida, Zona drilling und intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) erfolgen. Mit der konventionellen IVF wurden bisher nur geringe Fertilisationsraten (0-25 %) erzielt, während man mit der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion Fertilisationsraten von bis zu 52 % erreichen konnte. Beide Techniken haben nach dem Transfer zur Geburt lebender Fohlen geführt. Zur Reifung der befruchteten Oozyten bis zum Morula- oder Blastozystenstadium ist sowohl die Kultur *in vivo* als auch *in vitro* geeignet. Bei der *in vitro*-Kultur scheint die Co-Kultur mit somatischen Zellen für die Entwicklung der Embryonen entscheidend zu sein. Die Produktion lebender Fohlen aus *in vitro* kultivierten Embryonen, welche aus *in vitro* gereiften Oozyten durch intrazytoplasmatische Spermieninjektion entstanden waren, ist bereits gelungen.

## 16. Summary

### Assisted reproduction in the horse

#### -a review-

In the mare, the practical use of assisted reproduction techniques has been very limited so far. Embryo transfer is used only in a few countries to a low extent. The main reason for this situation is that there is no practical method available for superovulation in the mare. The majority of equine embryos are therefore collected from spontaneously ovulating mares.

Synchronisation of the oestrous cycle of the donor and recipient mare before transfer is of major importance. In synchronized recipients, ovulation should occur one day before to three days after the donor mare's ovulation. Ovariectomized, hormone-treated mares have also been used as embryo recipients. In young, fertile mares embryo recovery rates up to 90 % have been reported. Embryo recovery rates for older, infertile mares are only between 20 to 40 %.

Embryo recovery is generally performed nonsurgically by transvaginal flushing of the uterus. Nonsurgical recovery of embryos is not possible before day 6 post ovulation. Equine embryos are transferred by surgical flank incision or by nonsurgical, transvaginal transfer. Surgical transfer is mainly used in commercial embryo transfer programs with pregnancy rates up to 80%. The advantage of nonsurgical transfer is the noninvasive technique and the low costs, but results vary tremendously.

Cooled, transported embryos offer great advantages in the management of transfer programs. Cooling for 24 to 30 hours does not seem to impair the viability of embryos. Conventional methods of cryopreservation or vitrification can be used for long term storage of equine embryos. Smaller embryos withstand cryopreservation better than large embryos. Micromanipulation of equine embryos can be used to produce monozygotic twins and for embryo sexing.

The efficiency of embryo production by extracorporal fertilization in the horse is very low so far. Equine oocytes can be recovered by one of four methods: surgically, by transcutaneous flank puncture, by transvaginal aspiration or by aspirating, scraping or rupturing follicles of slaughterhouse ovaries. Different culture media can be used for *in vitro* oocyte maturation. After 30 hours of incubation in TCM 199, the maturation rate of equine oocytes to metaphase II is up to 80 % . *In vivo* fertilization of oocytes can be achieved by surgical transfer into the oviduct or follicles of inseminated recipient mares. The procedure of

gamete intrafallopian tube transfer (GIFT) involves transfer of oocytes and spermatozoa into the oviduct of a recipient mare. Since only low sperm numbers are required, GIFT can be used for subfertile stallions, frozen-thawed semen and sexed spermatozoa. Conventional methods or vitrification can be applied for the cryopreservation of equine oocytes. Maturation rates *in vitro* are lower for frozen-thawed than for fresh oocytes but results of *in vitro* fertilization rates are comparable. In contrast, embryonic development rates of frozen-thawed oocytes seem to be affected by cryopreservation.

*In vitro* fertilization of matured oocytes can be performed by co-incubation of oocytes and spermatozoa or by assisted fertilization techniques such as mechanical manipulation of the zona pellucida, zona drilling or intracytoplasmic sperm injection (ICSI). Fertilization rates with conventional methods are low (0-25 %), whereas fertilization rates up to 52% are reported with ICSI. Viable offspring has been produced with both techniques. Fertilized oocytes can be cultured to the stage of morula or blastocyst *in vivo* or *in vitro*. Co-culture with somatic cells seems to be important for embryonic development *in vitro*. Live foals have already been produced using *in vitro* cultured embryos, which developed from ICSI of *in vitro* matured oocytes.

## 17. Anhang

- Tabelle I: Ergebnisse des Embryotransfers und der *in vitro*-Entwicklung nach der Kryokonservierung
- Tabelle II: Verschiedene Protokolle zum Tiefgefrieren von Pferdeoozyt



**Tabelle I:** Ergebnisse des Embryotransfers und der *in vitro*-Entwicklung nach der Kryokonservierung modifiziert nach SEIDEL (Seidel 1996)

Literatur	Kryo- protektivum	Entwicklungs- stadium	Zugabe des Kryo- protektivums	Abkühlrate	Auftauen + Verdünnung des Kryoprotektivums	Transfer (trächtig) [ausgetragen]	<i>in vitro</i> - Entwicklung
Griffin (Griffin et al. 1981)		d 5-9				4 (1)	
Yamamoto (Yamamoto et al. 1982)	1,5M DMSO 1,5M DMSO 1,0M Glyzerin 1,0M Glyzerin	d 6 M, EB d 8 EXB d 6 M, EB d 8 EXB	DMSO: 0,5M und 1,0M für 10min, 1,5M für 30min Glyzerin: 0,5M für 10 min, 1,0M für 30min	0,5-1,0°C/min bis -5°C; seeding; 0,17-0,22°C/min bis -70°C, dann in flüssigen Stickstoff	Aufwärmen 95°C/min bis - 70°C, 1,4-10°C/min bis - 10°C, 8°C/min bis 20°C; 6 Schritte für jeweils 10 min in 1,25; 1,0; 0,75; 0,5; 0,25; 0 M DMSO 0,5; 0 M Glyzerin	12 (0) 4 (0) 11 (3) [1] 5 (0)	
Takeda (Takeda et al. 1984)	1,32M Glyzerin       10% Glyzerin	d 6 M, EB      d 6-7 M, EB, EXB		1°C/min bis -7°C; seeding a: 0,3°C/min bis -26°C, 0,1°C/min bis -38°C oder b: 0,3°C/min bis -35°C, 0,1°C/min bis -38°C  a oder b	37°C Wasserbad; 6 Verdünnungsschritte für jeweils 10 min	a: 2 (1) [1]  b: 2 (1) [1]	Entw. nach 24h: a: d 6: 4/7, d 7: 1/7 b: d 6: 5/7, d 7: 2/7

Literatur	Kryo- protektivum	Entwicklungs- stadium	Zugabe des Kryo- protektivums	Abkühlrate	Auftauen + Verdünnung des Kryoprotektivums	Transfer (trächtig) [ausgetragen]	<i>in vitro</i> - Entwicklung
Slade (Slade et al. 1984)	10% Glyzerin          10% Glyzerin	d 6 EB, EXB         d 6 EB d 6 EXB	zwei Schritte: 5%, dann 10%	4°C/min bis -6°C; seeding; a: 0,3°C/min bis -30°C, a: 0,1°C/min bis -33°C Glasampullen oder Plastikpailletten b: 0,3°C/min bis -35°C, 0,1°C/min bis -38°C Glasampullen oder Plastikpailletten wie a in Pailletten	37°C Wasserbad; 6 Verdünnungsschritte für jeweils 10 min	         13 (8) 10 (1)	a: 4/8 (Glasampullen) 7/8 (Plastikpailletten) b: 1/8 (Glasampullen) 5/8 (Plastikp.)
Boyle (Boyle und Allen 1985)	10% Glyzerin	d 6-8 M, EB EXB	4 Schritte, jeweils 10 min 2,5; 5; 7,5; 10%	1°C/min bis -6°C, seeding, 0,3°C/min bis -35°C oder -40°C	37°C Wasserbad; 4 Verdünnungsstufen für jeweils 10 min	M EB: 16 (3) [1] EXB: 7 (0) -35°C: 16 (3) [1] -40°C: 7 (0)	
Czlonkowska (Czlonkowska et al. 1985)	10% Glyzerin	d 6-8 M, EB, EXB	4 Schritte, jeweils 10 min	1°C/min bis -6°C, seeding, ≤ -3°C/min bis -35°C oder -40°C	37°C Wasserbad; 4 Verdünnungsschritte für jeweils 10 min	-35°C: 7 (2) [1] -40°C: 7 (2) [0]	

Literatur	Kryo- protektivum	Entwicklungs- stadium	Zugabe des Kryo- protektivums	Abkühlrate	Auftauen + Verdünnung des Kryoprotektivums	Transfer (trächtig) [ausgetragen]	<i>in vitro</i> - Entwicklung
Wilson (Wilson und al. 1986)	10% Glyzerin	d 6 M, EB, EXB	1 Schritt 30 min	seeding bei $-6^{\circ}\text{C}$ , $0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bis $-30^{\circ}\text{C}$	$25^{\circ}\text{C}$ Wasserbad; für 30 min in Medium mit 1,08M Saccharose	10 (3) [2]	
Seidel (Seidel et al. 1989)	10% Propandiol	d 6,5-7	5% für 5min, 10% für 10-20min	$4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bis $-6^{\circ}\text{C}$ , seeding nach 5 min, weitere 10 min bei $-6^{\circ}\text{C}$ , dann a: $0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bis $-33^{\circ}\text{C}$ b: $0,8^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bis $-33^{\circ}\text{C}$	$37^{\circ}\text{C}$ Wasserbad oder Auftauen an der Luft; 3 Verdünnungsstufen: 1. 6%Propandiol+ 10% Saccharose 2. 3%Propandiol+ 10% Saccharose 3. 10% Saccharose		Morpholog. Beurteilung nach 48h : a + Wasserbad: 3,4 a+ Luft: 4,2 b+ Wasserbad: 3,7 b + Luft: 4,2
Squires (Squires et al. 1989)	A: 10% Glyzerin B: 10% Glyzerin+ 8,6% Saccharose C: 15% Glyzerin+ 15% Saccharose	d 6,5-7 M, EB, EXB, Gruppe A: $<200\mu\text{m}$ B+C: $>200\mu\text{m}$	A: 5% für 10min, 10% für 10-20 min B: 10% Glyzerin 5min, plus 8,6 Saccharose 10-15min C: 15% Glyzerin 5min, plus 15 Saccharose 10 min	$4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bis $-6^{\circ}\text{C}$ , seeding, A: $0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bis $-30^{\circ}\text{C}$ , $0,1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bis $-33^{\circ}\text{C}$ B: $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bis $-25^{\circ}\text{C}$ C: in Gefrierschrank bei $-25^{\circ}\text{C}$ zwischen Gel- kühlelementen 30min	A: $37^{\circ}\text{C}$ Wasserbad 20s B+C: $37^{\circ}\text{C}$ Wasserbad od. 20s an der Luft+ 20s Wasserbad $37^{\circ}\text{C}$ 6 Verdünnungsstufen für jeweils 6min, 10% Saccharose pro Stufe ent- halten	A: 8 (4) B+C: 24 (2)	

Literatur	Kryo- protektivum	Entwicklungs- stadium	Zugabe des Kryo- protektivums	Abkühlrate	Auftauen + Verdünnung des Kryoprotektivums	Transfer (trächtig) [ausgetragen]	<i>in vitro</i> - Entwicklung
Lagneaux (Lagneaux und Palmer 1991)	Glyzerin	d 6  >160µm  < 160µm		seeding bei -7°C, 0,3°C/min bis -30°C	37°C Wasserbad	48 (8)  22 (0)  26 (8)	
Rieger (Rieger et al. 1991)	10% Glyzerin	d 6 M, EB	jeweils 5min in 2,5; 5; 7,5; 10%	3°C/min bis -7°C, seeding, 0,3°C/min bis - 30°C	37°C Wasserbad, 7 Stufen jeweils 5min in 10; 3,3; 6,7; 5; 3,3; 1,; 0% Glyzerin		% pyknotische Kerne nach 6h: Glyzerin : 54 +eingefroren: 57 Kontrollgruppe: 32
Skidmore (Skidmore et al. 1991)	10% Glyzerin	d 6 M, EB	A: 2 Stufen B: 4 Stufen	A:4°C/min oder B: 1°C/min bis -6°C, seeding, 0,3°C bis -30°C, dann A:0,1°C/min bis -33°C oder B:0,3°C/min bis -35°C	20 s an der Luft+ 20s 37°C Wasserbad jeweils 10 min A:7 Stufen B:5 Stufen	A: 11 (4) B: 11 (6)	
Bruyas (Bruyas et al. 1993)	10% Glyzerin	d 6,5 EB, EXB	für jeweils 5min in 2,5; 5; 7,5 und 10%	3°C/min bis -7°C, seeding, 0,3°C/min bis - 30°C	37°C Wasserbad 6 Stufen jeweils 5 min 8,3; 6,7; 5,0; 3,3; 1,6 und 0%		Morpholog. Bewertung nach 6h ( % pyknot. Kerne) Glyzerin: 3,2 (39) +einfrieren: 2,8 (42) Kontrollgr: 1,8 (13)

Literatur	Kryo- protektivum	Entwicklungs- stadium	Zugabe des Kryo- protektivums	Abkühlrate	Auftauen + Verdünnung des Kryoprotektivums	Transfer (trächtig) [ausgetragen]	<i>in vitro</i> - Entwicklung
Meira (Meira et al. 1993)	A: 11% Glyzerin B: 11% Glyzerin C: 11% Propandiol	d 6-7 A: EXB B+C: M, EB	5,5% für 10min 11% für 20-25min	2,5-4°C/min bis -6°C, seeding, 0,3-0,6°C/min bis -30°C	37°C Wasserbad 20s 5 Verdünnungsstufen jeweils 8-10min; 7,3; 5,5; 3,7; 1,8 und 0%	A: 12 (0) B: 15 (6) C: 15 (0)	
Hochi (Hochi et al. 1994)	40% Ethylenglykol + 18% Ficoll+ 0,3M Saccharose (EFS-Lösung)	d 5-7 M, EB	A: 1-2min in EFS-Lsg. B: 10-20min in + 20%Ethylen- C glykol, 1- 2min in EFS	1min in Stickstoffverdampfer	20°C Wasserbad 20s 0,5M Saccharose A+B: 1 Stufe C: 4 Stufen	5 (2)	nach 120h A: 0/7 B: 4/7 C: 4/7
Poitras (Poitras et al. 1994)	A: 10%in B: in Agarchip, 10% Glyzerin	d 6,5 M, EB, EXB	A: 5% 10min 10% 20 min B: wie A, vorher in Agarchip	4°C/min bis -7°C, seeding, 0,3°C/min bis -30 oder -33°C	37°C Wasserbad 10s 5 Verdünnungsschritte je 10min		
Hochi (Hochi et al. 1995)	40% Ethylenglykol + 18% Ficoll+ 0,3M Saccharose	d 6-8 A: <200µm B: 200-300µm C: >300µm	20 min 20% Ethylenglykol, dann in EFS-Lsg	1 min in Stickstoffverdampfer (<-180°C)	20°C Wasserbad 20s 0,5M Saccharose 10min		nach 48h: A: 7/8 B: 6/8 C: 2/8

Literatur	Kryo- protektivum	Entwicklungs- stadium	Zugabe des Kryo- protektivums	Abkühlrate	Auftauen + Verdünnung des Kryoprotektivums	Transfer (trächtig) [ausgetragen]	<i>in vitro</i> - Entwicklung
Hochi (Hochi et al. 1996)	A: 10% Ethylenglykol B: 10% Glycerin C: 10% Ethylenglykol+ 0,1M Saccharose (ES-Lsg)	d 6	A+B: 10 min 5% 10 min 10% C: 10 min ES-Lsg	0,5°C/min bis -6°C, seeding, 0,3°C/min bis -35°C	37°C Wasserbad A+B: 6 Stufen je 10min C: für Kultur direkt in PBS für Transfer 2 Verdünnungsschritte	A:8 (2) B: 8 (3) C: 11 (7)	Größenzunahme in % nach 48h: A: 171% C: 202%
Bruyas (Bruyas et al. 1997)	A: 1,5M DMSO B: 1,5M DMSO C: Kontrolle	d 6,5	A+B: je 10 min in 0,5; 1 und 1,5M	A: bleibt bei 22°C B: -7°C, seeding, 0,3°C/min bis -35°C	B: 37°C Wasserbad A+B: 4 Stufen je 10min		% pyknot. Kerne nach 6h: A: 1,4 B: 82,2 C:1,2
Chaves (Chaves et al. 1997)	A: 25% Glycerin+ 25% Ethylenglykol (GE-Lsg.) B: 8M Ethylenglykol+ 7%Polyvinylpyrrolidon (EP-Lsg.)	d 7	A:10% Glycerin+ 20% Ethylengl. für 4 min., GE-Lsg.für 30s B: 2M Ethylengl. für 5 min, EP-Lsg. für30s	direkt in flüssigen Stickstoff	A: 37°C Wasserbad 10s 0,5; 0,25M Saccharose für 5 min B: 25°C Wasserbad 10s direkt in mPBS		Anfärben+ Fluoreszenz messen (Farbe= Leben): A: 1/8 +, 4/8 +/-, 3/8 - B: 1/7 +, 2/7 +/-, 4/7 -

Literatur	Kryo- protektivum	Entwicklungs- stadium	Zugabe des Kryo- protektivums	Abkühlrate	Auftauen + Verdünnung des Kryoprotektivums	Transfer (trächtig) [ausgetragen]	<i>in vitro</i> - Entwicklung
Young (Young et al. 1997)	A: 1,0M Glyzerin B: 2,0M Glyzerin+ 0,3M Galaktose C: 11,9M Ethylenglykol+ 0,0026M Ficoll + 0,3M Galaktose (EFG-Lsg.)	d 7-8 300-680µm	A: 1,0M Glyzerin 15 min B: 2,0M Glyzerin, 4,0M Glyzerin je 4min, 2 M Glyzerin+ 0,3M Galaktose 5min C: 15 min 4,5M Ethylenglykol , 1 min EFG-Lsg.	A+ B: 4°C/min bis -6°C, seeding, 0,5°C/min bis - 35°C C: Stickstoffverdampfer für 1 min	12s an der Luft, 12s 37°C Wasserbad A+B: 4 Stufen je 5min C: je 5 min 0,6; 0,3; 0,15 und 0M Galaktose	B: 5 (2)	Morpholog. Beurteilung nach 36h: A: 7 degeneriert B: 4x Grad 1 1x Grad 2 1x Grad 3 C: 1x Grad 2 1x Grad 3 6 degeneriert
Bruyas (Bruyas et al. 2000)	A+B: 1,5M Glyzerin C+D: 1,5M Ethylenglykol	d 6 M, EB	A+B: 4 Stufen: 0,375; 0,75; 1,125; 1,5M C+D: 3 Stufen 0,5; 1; 1,5M	3°C/min bis -7°C, seeding, 0,3°C/min bis -30°C	37°C Wasserbad 60s A: 5 Stufen B: 5 Stufen mit 0,25M Saccharose C: 4 Stufen D: 4 Stufen mit 0,25M Saccharose		nach 6h: Anzahl degenerierter Zellen bei A+B < C+D

Literatur	Kryo- protektivum	Entwicklungs- stadium	Zugabe des Kryo- protektivums	Abkühlrate	Auftauen + Verdünnung des Kryoprotektivums	Transfer (trächtig) [ausgetragen]	<i>in vitro</i> - Entwicklung
Oberstein (Oberstein et al. 2001)	A: 1,8M Ethylen- glykol+ 0,1M Saccharose B: 16,5% Ethylen- glykol, 16,5% DMSO, 0,5M Saccharose C: 17,5% Ethylen- glykol, 17,5% DMSO, 1M Saccharose, 0,25µM Ficoll	d 6-7 M, EB	A: slow-cooled 1,8M EG+ 0,1M Saccharose 10 min B: OPS 7,5% DMSO+ 7,5% EG 3 min, Lsg. B für 20-30s C: cryoloop 7,5% DMSO+ 7,5% EG 2,5 min, Lsg. C für 20-30s	A: 0,5°C/min bis -6°C, seeding, 0,3°C/min bis -35°C B+C: direkt in flüssigen Stickstoff	A: 10s an der Luft, 20s Wasserbad, dann direkt in H-SOF B: offenes Ende in H-SOF + 0,15M Saccharose für 5 min., dann 2x H-SOF für 5 min C: 840µl H-SOF zuerst + 420 µl H-SOF mit 1M Saccharose 2,5min., dann + 210ml H-SOF mit 1M Saccharose für 3min., dann ohne Saccharose für 5 min.		Beurteilung nach 20h: A: 2,9 B: 3,1 C: 3,3 % lebende Zellen: A: 74 B: 51 C: 48
Huhtinen (Huhtinen et al. 2000)	A: Glycerin+ 50mM Glutamin B: 1,5M Emcare Ethylenglykol	150-190µm	A: 4 Stufen B: 1,5M Emcare Ethylenglykol		10s an der Luft, 20s im Wasserbad 30°C A: 6 Schritte mit Saccharose	A: 9 (4) B: 10 (3)	

M= Morula, EB= frühe Blastozyste, EXB= expandierte Blastozyste

d= Alter der Embryonen in Tagen

OPS= open-pulled straw, DMSO= Dimethylsulfoxid



**Tabelle II:** Verschiedene Protokolle zum Tiefgefrieren von Pferdeoozyten

PBS = phosphate buffered saline

TCM = tissue culture medium

FBS = fetal bovine serum

NCS = newborn calf serum

IVF = *in vitro*-Fertilisation

Literatur	Kryo- protektivum	Entwicklungs- stadium	Zugabe des Kryo- protektivums	Abkühlrate	Auftauen + Verdünnung des Kryo- protektivums	<i>in vitro</i> -Reifung Metaphase II	Fertilisation
Hochi (Hochi et al. 1994)	A: Ethylenglykol B: Propandiol C: Glycerin jeweils 10% + 0,1M Saccharose	A: 1:immatur (Reifung nach Auftauen) / 2:matur B,C: immatur	1 Schritt für 10min.	seeding bei $-6^{\circ}\text{C}$ dann $0,3^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ auf $-35^{\circ}\text{C}$ , dann in flüssigen Stickstoff	Wasserbad $37^{\circ}\text{C}$ für 20s, Oozyten direkt in PBS + FBS	A: 15,8% B: 5,8% C: 0%	A: IVF 2 Pronuklei bei 1:immatur: 27,5% 2:matur: 7,5%
Hochi (Hochi et al. 1996)	40% Ethylen- glykol (EG) + 18% Ficoll + 0,3M Saccharose	immatur	1+4: 1 Schritt 2+5: 10 min. 3+6: 20 min. 20% EG 1-3 bei $20^{\circ}\text{C}$ 4-6 bei $30^{\circ}\text{C}$	Vitrifikation		1: 2,2%, 2: 16%, 3: 16,7%, 4: 1,9%, 5: 10%, 6: 8,2%	
Hurt (Hurt et al. 1999)	5M Ethylen- glykol + 18% Ficoll + 0,5M Saccharose	A: immatur B: matur	2,5M EG + 18% Ficoll + 0,5M Saccharose für 30s, dann mit 5M EG für 25-20s	Vitrifikation, open pulled straw	TCM199 + 10% NCS + 0,25M Saccharose bei $37^{\circ}\text{C}$ für 1min., dann mit 0,15M Saccharose für 5min.	A: 30% B: 40%	

Literatur	Kryo- protektivum	Entwicklungs- stadium	Zugabe des Kryo- protektivums	Abkühlrate	Auftauen + Verdünnung des Kryo- protektivums	<i>in vitro</i> -Reifung Metaphase II	Fertilisation
Maclellan (Maclellan et al. 2001)	20% Dimethyl- sulfoxid (DMSO) + 20% Ethylenglykol + 0,65M Trehalose od. Saccharose	A: 12h B: 24h nach Beginn der Reifung	5% DMSO + 5% EG 30s, dann 10% DMSO + 10% EG 30s, dann 20% DMSO + 20% EG + 0,25M Zucker	Vitrifikation, cryoloop	3 Stufen: 0,25M, 0,188M, 0,125M Saccharose oder Trehalose		ICSI, 2 Pronuklei bei Saccharose A: 50%, B: 41% Trehalose A: 43%, B: 42%

## 18. Literaturverzeichnis

Allen WR, Kydd J, Boyle MS, Antczak DF (1985). "Between-species transfer of horse and donkey embryos: A valuable research tool." *Equine Vet J* 3 (Suppl): 53-62.

Allen WR, Pashen RN (1984). "Production of monocygotic (identical) horse twins by embryo micromanipulation." *J Reprod Fertil* 71: 607-13.

Allen WR, Rowson LEA (1975). "Surgical and non-surgical egg transfer in horses." *J Reprod Fertil* 23 (Suppl): 525-30.

Allen WR, Stewart F, Trounson AO, Tischner M, Bielanski W (1976). "Viability of horse embryos after storage and long-distance transport in the rabbit." *J Reprod Fertil* 47: 387-90.

Alm H, Hinrichs K (1996). "Effect of cycloheximide on nuclear maturation of horse oocytes and its relation to initial cumulus morphology." *J Reprod Fertil* 107: 215-20.

Alm H, Torner H (1994). "In vitro maturation of horse oocytes." *Theriogenology* 42: 345-49.

Alm H, Torner H, Blottner S, Nurnberg G, Kanitz W (2001). "Effect of sperm cryopreservation and treatment with calcium ionophore or heparin on in vitro fertilization of horse oocytes." *Theriogenology* 56 (5): 817-29.

Alm H, Torner H, Kanitz W, Becker F (1997). "Oozytengewinnung bei der Stute-Vergleich unterschiedlicher Methoden." *Archiv für Tierzucht* 40: 202.

Alm H, Torner H, Kanitz W, Becker F, Hinrichs K (1997). "Comparison of different methods for the recovery of horse oocytes." *Equine Vet J* 25 (Suppl): 47-50.

Alvarenga MA, Landim e Alvarenga FC, Meira C (1993). "Modifications in the technique used to recover equine embryos." *Equine Vet J* 15 (Suppl): 111-12.

Alvarenga MA, McCue PM, Bruemmer J, Neves Neto JR, Squires EL (2001). "Ovarian superstimulatory response and embryo production in mares treated with equine pituitary extract twice daily." *Theriogenology* 56 (5): 879-87.

Andersen YC, Baltsen M, Byskov AG (1999). "Gonadotrophin-induced resumption of oocyte meiosis and meiosis-activating sterols." *Curr Topics Dev Biol* 41: 163-84.

Arbeiter K, Barth U, Jöchle W (1994). "Observations on the use of progesterone intravaginally and of deslorelin STI in acyclic mares for induction of ovulation." *J Equine Vet Sci* 14: 21-25.

Asbury AC (1988). "The use of prostaglandins in broodmare practice." *Proc Am Ass Equine Pract*: 196.

Austin CR, Short RV (1973). *Fertilization. Reproduction in mammals. Germ cells and fertilization.* London, Cambridge University Press. 1: 103-33.

Azuma T, Choi YH, Hochi S, Oguri N (1995). "Effect of glucose in the culture medium on development of horse oocytes matured and microfertilized in vitro." *Reprod Fertil Dev* 7: 1067-71.

Bailey MT, Bott RM, Gimez T (1995). "Breed registries' regulations on artificial insemination and embryo transfer." *J Equine Vet Sci* 15: 60-66.

Ball BA, Altschul M, Ellington JE (1991). "In vitro development of day-2-equine embryos co-cultured with oviductal explants or trophoblastic vesicles." *Theriogenology* 35 (3): 669-82.

Ball BA, Brinsko SP, Thomas PGA, Miller PG, Ellington JE (1993). "Development to blastocysts of 1- to 2-cell equine embryos after co-culture with uterine tubal epithelial cells." *Am J Vet Res* 54: 1139-44.

Ball BA, Little TV, Hillman RB, Woods GL (1986). "Pregnancy rates at days 2 and 14 and estimated embryonic loss rates prior to day 14 in normal and subfertile mares." *Theriogenology* 26: 611-19.

Ball BA, Little TV, Weber JA, Woods GL (1989). "Survival of day-4-embryos from young, normal mares and aged, subfertile mares after transfer to normal recipient mares." *J Reprod Fertil* 85: 187-94.

Ball BA, Miller PG (1992). "Survival of equine embryos co-cultured with equine oviductal epithelium from the four- to eight-cell to the blastocyst stage after transfer to synchronous recipient mares." *Theriogenology* 37: 979-91.

Baltsen M, Bøgh IB, Byskov AG (2001). "Contents of meiosis activating sterols in equine follicular fluids." *Theriogenology* 56: 133-45.

Baltsen M, Byskov AG (1999). "Quantitation of meiosis activating sterols in human follicular fluid using HPLC and photodiode array detection." *Biomed Chromatogr* 13: 382-88.

Barrier-Battut I, LePoutre N, Trocherie E, Hecht S, Grandchamp des Raux A, Nicaise JL, Verin X, Bertrand J, Fieni F, Hoier R, Renault A, Ergon L, Tainturier D, Bruyas JF (2001). "Use of Buserelin to induce ovulation in the cyclic mare." *Theriogenology*: 1679-95.

Barry BE, Thompson DL, White KL, Wood TC, Hehnke KE, Rabb MH, Colborn DR (1989). "Viability of inner cell mass versus trophectodermal cells of frozen-thawed horse embryos." *Equine Vet J* 8 (Suppl): 82-83.

Battut I, Bezard J, Palmer E (1991). "Establishment of equine oviduct cell monolayers for co-culture with early equine embryos." *J Reprod Fertil* 44 (Suppl): 393-403.

Bavister BD (1988). "Role of oviductal secretions in embryonic growth in vivo and in vitro." *Theriogenology* 29: 143-54.

Becker F, Kanitz W, Alm H (1997). "Investigation of repeated follicular aspiration in mares." *Reproduction in Domestic Animals* 32: 36.

Betteridge KJ (1989). "The structure and function of the equine capsule in relation to embryo manipulation and transfer." *Equine Vet J* 8 (Suppl): 92-100.

Betteridge KJ, Eaglesome MD, Mitchell D, Flood PF, Beriault R (1982). "Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation: observations on fresh specimens." *J Anat* 135 (1): 191-209.

Betteridge KJ, Flechon JE (1988). "The anatomy and physiology of pre-attachment bovine embryos." *Theriogenology* 29: 155-187.

Betteridge KJ, Guillomot M (1982). "Scanning electron microscopy of preattachment horse embryos." *J Reprod Fertil* 32 (Suppl): 623.

Betteridge KJ, Mitchell D (1974). "Direct evidence of retention of unfertilized ova in the oviduct of the mare." *J Reprod Fertil* 39: 145-48.

Bezard J (1992). In vitro fertilization in the mare. *Int Sci Conf Biotechnics in Horse Reprod*, Agricultural University of Krakow, Poland.

Bezard J, Mekarska A, Goudet G, Duchamp G, Palmer E (1997). "Meiotic stage of the preovulatory equine oocyte at collection and competence of immature oocytes for in vitro maturation: effect of interval from induction of ovulation to follicle puncture." *Theriogenology* 47 (1): 386.

Bezard J, Mekarska A, Goudet G, Duchamp G, Palmer E (1997). "Timing of in vivo maturation of equine preovulatory oocytes and competence for in vitro maturation of immature oocytes collected simultaneously." *Equine Vet J* 25 (Suppl): 33-37.

Bezard J, Palmer E (1992). In vitro maturation of horse oocytes from slaughtered ovaries. *12th International Congress on Animal Reproduction*, The Hague, The Netherlands.

Biven J, Palmer E, Vogelsang S, Cook V (1989). "Commercial equine embryo transfer: Synopsis of panel discussion." *Equine Vet J* 8 (Suppl): 75.

Blanchard T, Varner D (1994). Manipulation of estrus in the mare. *Annual Conference of the Society for Theriogenology*, Kansas City, MO.

Blue BJ, McKinnon AO, Squires EL, Seidel GEJ, Muscari KT (1989). "Capacitation of stallion spermatozoa and fertilisation of equine oocytes in vitro." *Equine Vet J* 8 (Suppl): 111-116.

Bogh IB, Bezard J, Duchamp G, Baltzen M, Gerard N, Daels P, Greve T (2002). "Pure preovulatory follicular fluid promotes in vitro maturation of in vivo aspirated equine oocytes." *Theriogenology* 57: 1765-79.

Bollwein H, Braun J (1999). "Follikeldynamik nach Anwendung von hCG für die Ovulationsinduktion bei der Stute." *Tierärztl Praxis* 27: 47-51.

Bousquet D, Guillomot M, Betteridge KJ (1987). "Equine zona pellucida and capsule: some physiochemical and antigenic properties." *Gamete Res* 16: 121-32.

Bowen MJ, Salisbury JM, Bowen JM, Kraemer DC (1985). "Non-surgical embryo auto-transfer in the mare." *Equine Vet J* 3 (Suppl): 100-02.

Boyle MS, Allen WR (1985). "Storage and international transport of horse embryos in liquid nitrogen." *Equine Vet J* 3 (Suppl): 36-39.

Bracher V, Parlevliet J, Fazeli AR, Pieterse MC, Vos PLAM, Dieleman SJ, Taverne MAM, Colenbrander B (1993). "Repeated transvaginal ultrasound-guided follicle aspiration in the mare." *Equine Vet J* 15 (Suppl): 75-78.

Braun J (1994). "Embryotransfer beim Pferd-derzeitiger Stand und Zukunftsperspektiven." *Tierärztl Praxis* 22: 558-66.

Braun J, Leidl W (1988). "Einsatzmöglichkeiten des Embryotransfers beim Pferd." *Tierärztl Umschau* 43: 410-13.

Braun J, Moriuchi Y, Nakagawa S, Hochi S, Miyamoto A, Oguri N (1994). "Follicular development, progesterone and estradiol-17 $\beta$  during spontaneous and FSH-stimulated estrous cycles in Hokkaido Native Pony and Thoroughbred mares." *J Reprod Dev* 40: 141-47.

Brinsko SP, Ball BA, Miller PG, Thomas PGA (1994). "In vitro development of day two embryos obtained from young, fertile mares or aged, subfertile mares." *Theriogenology* 41: 169.

Brinsko SP, Ball BA, Ellington JE (1995). "In vitro maturation of equine oocytes obtained from different age groups of sexually mature mares." *Theriogenology* 44: 461-69.

Bristol F (1987). "Control of the mare's reproductive cycle." *Proc Soc Therio*: 309.

Brockschmidt LD, Loch WE, Sikes JD (1985). "Effect of non-surgical embryo recovery and a prostaglandin analogue on the oestrous cycle of the pony mare." *Equine Vet J* 3 (Suppl): 34.

Brück I, Bezard J, Baltzen M, Synnestvedt B, Couty I, Greve T, Duchamp G (2000). "Effect of administering a crude equine gonadotrophin preparation to mares on follicular development, oocyte recovery rate and oocyte maturation in vivo." *J Reprod Fertil* 118: 351-60.

Brück I, Grondahl T, Host T, Greve T (1995). "In vitro maturation of equine oocytes: effect of follicular size, cyclic stage and season." *Theriogenology*: 75-84.

Brück I, Raun K, Synnestvedt B, Greve T (1992). "Follicle aspiration in the mare using a transvaginal ultrasound-guided technique." *Equine Vet J* 24: 58-59.

Brück I, Synnestvedt B, Greve T (1997). "Repeated transvaginal oocyte aspiration in unstimulated and FSH- treated mares." *Theriogenology* 47: 1157-67.

Bruyas JF, Battut I, Pol JM (1994). Quantitative analysis of morphological modifications of day 6,5 horse embryos after treatment with 4 cryoprotectants. 6th International Symposium on Equine Reproduction, Caxambu, Brazil.

Bruyas JF, Bezard J, Lagneaux D, Palmer E (1993). "Quantitative analysis of morphological modifications of day 6.5 horse embryos after cryopreservation: Differential effects on inner cell mass and trophoblast cells." *J Reprod Fertil* 99: 15.



Bruyas JF, Marchand P, Fieni F, Tainturier D (1997). "The inability of DMSO to effectively cryoprotect day 6.5 horse embryos." *Theriogenology* 47: 387.

Bruyas JF, Trocherie E, Hecht S, Lepoutre N, Granchamp des Raux A, Nicaise JL, Verin X, Bertrand J, Barrier-Battut I, Fieni F, Hoier R, Renault A, Egron L, Tainturier D (2000). Use of Busereline to induce ovulation in donor mares. 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer, Saari, Finland, Havemeyer Foundation.

Byskov AG, Andersen CY, Nordholm L, Thogersen H, Guoliang X, Wassman O, Andersen JV, Guddal E, Roed T (1995). "Chemical structure of sterols that activate oocyte meiosis." *Nature* 374: 559-62.

Camillo F, Vannozzi I, Rota A, Romagnoli S, Aria G (2000). Comparison of embryo recovery rates from two-year-old and mature mares. 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer, Saari, Finland, Havemeyer Foundation.

Carneiro G, Lorenzo P, Pimentel C, Pegoraro L, Bertolini M, Ball B, Anderson G, Liu I (2001). "Influence of insulin-like growth factor-I and its interaction with gonadotropins, estradiol, and fetal calf serum on in vitro maturation and parthenogenic development in equine oocytes." *Biol Reprod* 65 (3): 899-905.

Carnevale EM, Alvarenga MA, Squires EL, Choi YH (1999). Use of noncycling mares as recipients for oocyte transfer and GIFT. Annual Conference of the Society for Theriogenology.

Carnevale EM, Ginther OJ (1993). "Use of a linear ultrasonic transducer for the transvaginal aspiration and transfer of oocytes in the mare." *J Equine Vet Sci* 13: 331-33.

Carnevale EM, Ginther OJ (1995). "Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares." *Biol Reprod* 1: 209-14.

Carnevale EM, Griffin PG, Ginther OJ (1993). "Age-associated subfertility before entry of embryos into the uterus in mares." *Equine Vet J* 15 (Suppl): 31-35.

Carnevale EM, MacLellan LJ, daSilva MAC, Scott TJ, Squires EL (2000). "Comparison of culture and insemination techniques for equine oocyte transfer." *Theriogenology* 54: 981-87.

Carnevale EM, Maclellan LJ, Coutinho da Silva MA, Checure CM, Scoggin CF, Squires EL (2001). "Equine sperm - oocyte interaction: results after intraoviductal and intrauterine inseminations of recipients for oocyte transfer." *Anim Reprod Sci* 68: 305-14.

Carnevale EM, Ramirez RJ, Squires EL, Alvarenga MA, Vanderwall DK, McCue PM (2000). "Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer." *Theriogenology* 54: 965-79.

Carnevale EM, Squires EL, MacLellan LJ, Alvarenga MA, Scott TJ (2001). "Use of oocyte transfer in a commercial breeding program for mares with reproductive abnormalities." *J AVM A* 218: 87+.

Carnevale EM, Squires EL, McKinnon AO (1987). "Comparison of Ham's F 10 with CO<sub>2</sub> or HEPES buffer for storage of equine embryos at 5°C for 24H." *J Anim Sci* 65: 1775-81.

Carney NJ, Squires EL, Cook VM, Seidel GEJ, Jasko DJ (1991). "Comparison of pregnancy rates from transfer of fresh versus cooled, transported equine embryos." *Theriogenology* 36: 23-32.

Channing CP (1966). "Progesterone biosynthesis by equine granulosa cells growing in tissue culture." *Nature* 210: 1266.

Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis JL, Torres I (1989). "An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro." *J Reprod Fertil* 86: 679-88.

Chaves MG, Gonzalez EP, de Abreu Rosas C, Agüero A (1997). "Cryopreservation of equine embryos by two vitrification methods." *Theriogenology* 47: 388.

Choi YH, Hochi S, Braun J, Sato K, Oguri N (1993). "In vitro maturation of equine oocytes collected by follicle aspiration and by the slicing of ovaries." *Theriogenology* 40: 959-66.

Choi YH, Love CC, Chung YG, Varner DD, Westhusin ME, Burghardt RC, Hinrichs K (2002). "Production of nuclear transfer horse embryos by piezo-driven injection of somatic cell nuclei and activation with stallion sperm cytosolic extract." *Biol Reprod* 67: 561-67.

Choi YH, Love CC, Chung YG, Varner DD, Westhusin ME, Burghardt RC, Hinrichs K (2002). "Use of piezo-driven direct nuclear injection and activation with stallion sperm extract to produce horse nuclear transfer embryos." *Theriogenology* 58: 771-74.

Choi YH, Love CC, Love LB, Varner DD, Brinsko S, Hinrichs K (2002). "Developmental competence in vivo and in vitro of in vitro-matured equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed spermatozoa." *Reproduction* 123: 455-465.

Choi YH, Okada Y, Hochi S, Braun J, Sato K, Oguri N (1994). "In vitro fertilization rate of horse oocytes with partially removed zonae." *Theriogenology* 42: 795-802.

Choi YH, Shin T, Love CC, Burghardt RC, Varner DD, Hinrichs K (2001). "Effect of initial cumulus morphology and addition of cytochalasin B on fusion, activation and cleavage of horse oocytes undergoing nuclear transfer." *Theriogenology* 55: 261.

Choi YH, Shin T, Love CC, Johnson C, Varner DD, Westhusin ME, Hinrichs K (2002). "Effect of co-culture with theca interna on nuclear maturation of horse oocytes with low meiotic competence, and subsequent fusion and activation rates after nuclear transfer." *Theriogenology* 57 (3): 1005-11.

Clark KE, Squires EL, McKinnon AO, Seidel GEJ (1987). "Viability of stored equine embryos." *J Anim Sci* 65: 534-42.

Cochran R, Meintjes M, Reggio B, Hylan D, Carter J, Pinto C, Paccamonti D, Godke RA (1998). "Live foals produced from sperm-injected oocytes derived from pregnant mares." *J Equine Vet Sci* 18: 736-40.

Collins A, Palmer E, Bezard J, Burke J, Duchamp G, Buckley T (1997). "A comparison of the biochemical composition of equine follicular fluid and serum at four different stages of the follicular cycle." *Equine Vet J* 25 (Suppl): 12-16.

Cook NL, Squires EL, Cook VM, Jasko DJ (1992). "Transvaginal ultrasonically guided follicular aspiration of equine oocytes: preliminary results." *J Equine Vet Sci* 12: 204-07.

Cook NL, Squires EL, Ray BS, Jasko DJ (1993). "Transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration of equine oocytes." *Equine Vet J* 15 (Suppl): 71-74.

Cook VM, Squires EL, McKinnon AO, Bailey J, Long PL (1989). "Pregnancy rates of cooled, transported equine embryos." *Equine Vet J* 3 (Suppl): 80-81.

Coutinho da Silva MA, Carnevale EM, Maclellan LJ, Preis KA, Leao KM, Squires EL (2002). "Use of fresh, cooled and frozen semen during gamete intrafallopian transfer in mares." *Theriogenology* 58: 763-66.

Coutinho da Silva MA, Carnevale EM, Maclellan LJ, Seidel GEJ, Squires EL (2002). "Effect of time of oocyte collection and site of insemination on oocyte transfer in mares." *J Anim Sci* 80 (5): 1275-79.

Czlonkowska M, Boyle MS, Allen WR (1985). "Deep freezing of horse embryos." *J Reprod Fertil* 75: 485-90.

Daels PF, Stabenfeldt GH, Hughes JP, Kindahl H, Odensvik K (1988). The role of PGF<sub>2a</sub> in embryonic loss following systemic infusion of *Salmonella Typhimurium* endotoxin in the mare and the protective action of altrenogest and flunixin meglumine. 11th Int Congr Anim Reprod and AI, Dublin, 511.

Darenius K, Frederiksson G, Kindahl H (1989). "Allyl trenbolone and flunixin meglumine treatment of mares with repeated embryonic loss." *Equine Vet J* 8 (Suppl): 35-39.

David JSE (1975). "A survey of eggs in the oviducts of mares." *J Reprod Fertil* 23 (Suppl): 513-17.

Davies CJ, Antczak DF, Allen WR (1985). "Reproduction in mules: Embryo transfer using sterile recipients." *Equine Vet J* 3 (Suppl): 63-67.

Day FT (1939). "Ovulation and the descent of the ovum in the fallopian tube of the mare after treatment with gonadotrophic hormones." *J Agric Sci Camb* 29: 459-69.

Day FT (1940). "Clinical and experimental observations on reproduction in the mare." *J Agric Sci* 30: 244.

DelCampo MR, Domoso MX, Parrish JJ, Ginther OJ (1990). "In vitro fertilization of in vitro-matured equine oocytes." *Equine Vet Sci* 10: 18-22.

DelCampo MR, Donoso MX, Parrish JJ, Ginther OJ (1995). "Selection of follicles, preculture oocyte evaluation and duration of culture for in vitro maturation of equine oocytes." *Theriogenology* 43: 1141-53.

DelCampo MR, Donoso MX, Parrish JJ (1992). "In vitro maturation of equine oocytes." *Theriogenology* 37: 200.

Dell'Aquila ME, Cho YS, Minoia P, Traina V, Fusco S, Lacalandra GM, Maritato F (1997). "Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) versus conventional IVF on abattoir-derived and in vitro-matured equine oocytes." *Theriogenology* 47: 1139-56.

Dell'Aquila ME, Fusco S, Lacalandra GM, Maritato F (1995). "In vitro maturation and fertilization of equine oocytes recovered during the breeding season." *Theriogenology*: 547-60.

Dell'Aquila ME, Masterson M, Maritato F, Hinrichs K (2001). "Influence of oocyte collection technique on initial chromatin configuration, meiotic competence, and male pronucleus formation after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of equine oocytes." *Molecular Reproduction and Development* 60 (1): 79-88.

Desjardins M, King WA, Bousquet D (1985). "In vitro maturation of horse oocytes." *Theriogenology* 23: 187.

Dippert KD, Hofferer S, Palmer E, Jasko DJ, Squires EL (1992). "Initiation of superovulation in mares 5 or 12 days after ovulation using Equine Pituitary Extract with or without GnRH Analogue." *Theriogenology* 38: 695-710.

Dippert KD, Jasko DJ, Seidel GE, Squires EL (1994). "Fertilization rates in superovulated and spontaneously ovulating mares." *Theriogenology* 41: 1411-23.

Dippert KD, Ray BS, Squires EL (1994). "Maximizing ultrasound-guided retrieval of equine oocytes." *Theriogenology* 41: 190.

Dobrinski I, Thomas PGA, Ball BA (1995). "Cryopreservation reduced the ability of equine spermatozoa attack to oviductal epithelial cells and zona pellucidae in vitro." *J Androl* 16: 536-42.

Douglas RH (1980). "Pregnancy rates following non-surgical embryo transfer in the equine." *J Anim Sci* 51(1) (Suppl): 272.

Douglas RH (1982). "Some aspects of equine embryo transfer." *J Reprod Fertil* 32 (Suppl): 405-08.

Douglas RH, Burns PJ, Hershman L (1985). "Physiological and commercial parameters for producing progeny from subfertile mares by embryo transfer." *Equine Vet J* 3 (Suppl): 111-14.

Douglas RH, Ginther OJ (1972). "Effect of prostaglandin F2a on length of diestrous in mares." *Res Prostaglandins* 2: 265.

Douglas RH, Nuti L, Ginther OJ (1974). "Induction of ovulation and multiple ovulations in seasonally-anovulatory mares with equine pituitary fractions." *Theriogenology* 2 (6): 133-42.

Dowsett KF, Woodward RA, Boder DAV (1989). "A study of nonsurgical embryo transfer in the mare." *Theriogenology* 31: 631-41.

Dozortsev D, Rybouchkin A, De Sutter P, Dhont M (1995). "Sperm plasma membrane damage prior to intracytoplasmic sperm injection: a necessary condition for sperm nucleus decondensation." *Human Reprod* 10: 2960-64.

Driancourt MA, Palmer E (1982). "Seasonal and individual effects on ovarian and endocrine responses of mares to a synchronization treatment with progestagen-impregnated vaginal sponges." *J Reprod Fertil* 32 (Suppl): 283-91.

Driancourt MA, Palmer E (1984). "Time of ovarian follicular recruitment in cyclic pony mares." *Theriogenology* 21: 591-600.

East LM, VanSaun RJ, Vandervall DK (1998). "Equine Embryo Transfer Part 1: Donor-Recipient Selection and Preparation." *Equine Practice* 20: 16-20.

East LM, VanSaun RJ, Vandervall DK (1999). "Equine Embryo Transfer Part 2: Embryo Recovery and Transfer Techniques." *Equine Practice* 21: 8-12.

Ellington JE, Blue BJ, Miller PG, Ball BA (1992). "Uterine tube (oviductal) epithelial cell culture systems for in vitro capacitation of stallion spermatozoa." *Theriogenology* 37 (1): 207.

Ellington JE, Carney EW, Farrell PB, Simkin ME, Foote RH (1990). "Bovine 1-2 cell embryo development using a simple medium in three oviduct epithelial cell coculture systems." *Biol Reprod* 43: 97-104.

Elsden RD, Seidel GEJ (1985). "Procedures for recovery, bisection, freezing and transfer of bovine embryos." *Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory Bulletin No 9*, Fort Collins, CO: Colorado State University 6th Edition: 6-7.

Farlin ME, Jasko DJ, Graham JK, Squires EL (1992). "Effects of calcium ionophore A23187 on stallion spermatozoa." *Theriogenology* 37: 209.

Farquhar VJ, McCue PM, Carnevale EM, Squires EL (2001). "Interovulatory intervals of embryo donor mares administered Deslorelin acetate to induce ovulation." *Theriogenology*.

Fitzgerald L, DiMattina M (1992). "An improved medium for long-term culture of human embryos overcomes the in vitro developmental block and increases blastocyst formation." *Fertil and Steril* 57: 641-47.

Fleming AD, Kuehl TJ, Armstrong DT (1985). "Maturation of pig and rat oocytes transplanted into surrogate pig follicles in vitro." *Gamete Res* 11: 107-19.

Fleury JJ, Costa Neto JBF, Alvarenga MA (1989). "Results from an embryo transfer programme with Mangalarga mares in Brazil." *Equine Vet J* 8 (Suppl): 73-74.

Flood PF, Betteridge KJ, Diocee MS (1982). "Transmission electron microscopy of horse embryos 3-16 days after ovulation." *J Reprod Fertil* 32 (Suppl): 319-27.

Flood PF, Betteridge KJ, Irvine DS (1979). "Oestrogens and androgens in blastocoelic fluid and cultures of cells from equine conceptuses of 10-22 days gestation." *J Reprod Fertil* 27 (Suppl): 413-20.

Forage RG, Brown RW, Oliver KJ, Atrache BT, Devine PL, al. e (1987). "Immunization against an inhibin subunit produced by recombinant DNA techniques results in increased ovulation rate in sheep." *J Endocrinol* 114: R1-R4.

Fortune JE, Kimmich TL (1993). "Purified pig FSH increases the rate of double ovulation in mares." *Equine Vet J* 15 (Suppl): 95-98.

Franz LC, Meira C, Squires EL, Seidel GEJ (2002). "Effect of time and temperature during transport of ovaries on nuclear and cytoplasmic maturation of equine oocytes." *Theriogenology* 57: 718.

Franz LC, Squires EL, O'Donovan BS, Scott TJ, Carnevale EC (2001). "Collection and in vitro maturation of equine oocytes from estrus, diestrus and pregnant mares." *J Equine Vet Sci* 1: 26-32.

Freeman DA, Weber JA, Geary RT, Woods GL (1991). "Time of embryo transfer through the mare oviduct." *Theriogenology* 36: 823-30.



Fulka JJ, Okolski A (1981). "Culture of horse oocytes in vitro." *J Reprod Fertil* 61: 213-15.

Gable TL, Woods GL (2001). "Confocal microscopy of germinal vesicle-stage equine oocytes." *Theriogenology* 55: 1417-30.

Galli C, Crotti G, Turini P, Duchi R, Mari G, Zavaglia G, Duchamp G, Daels P, Lazzari G (2002). "Frozen-thawed embryos produced by ovum pick up of immature oocytes and ICSI are capable to establish pregnancies in the horse." *Theriogenology* 58: 705-08.

Galli C, Maclellan LJ, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Duchi R, Mari G, Merlo B, Barbacini S, Lazzari G (2002). "Development of equine oocytes matured in vitro in different media and fertilised by ICSI." *Theriogenology* 57: 719.

Gerard N, Duchamp G, Goudet G, Bezard J, Magistrini M, Palmer E (1998). "A high-molecular-weight preovulatory-stage related protein in equine follicular fluid and granulosa cells." *Biol Reprod* 58: 551-57.

Gibbs HM, Troedsson MHT (1995). "Effect of acepromazine, detomidine and xylazine on myometrial activity in the mare." *Biol Reprod*: 489-93.

Ginther O (1992). "Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects." Equiservices, ed 2., Cross Plains, WI.

Ginther O, Pierson R (1989). "Regular and irregular characteristics of ovulation and the inter-ovulatory interval in mares." *J Equine Vet Sci* 9: 4.

Ginther OJ (1979). "Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects." Equiservices, Cross Plains, WI: 413pp.

Ginther OJ (1983). "Fixation and orientation of the early equine conceptus." *Theriogenology* 19: 613-23.

Ginther OJ (1983). "Mobility of the early equine conceptus." *Theriogenology* 19: 603-11.

Ginther OJ (1985). "Dynamic physical interactions between the equine embryo and uterus." *Equine Vet J* 3 (Suppl): 41-47.

Ginther OJ, Bergfelt DR (1990). "Effect of GnRH treatment during the anovulatory season on multiple ovulation rate and on follicular development during the ensuing pregnancy in mares." *J Reprod Fertil* 88: 119-26.

Ginther OJ, Douglas RH, Lawrence JR (1982). "Twinning in mares: a survey of veterinarians and analyses of theriogenology records." *Theriogenology* 18: 333-47.

Ginther OJ, Pierson RA (1984). "Ultrasonic anatomy and pathology of the equine uterus." *Theriogenology* 21: 505-15.

Goudet G, Belin F, Bezard J, Gerard N (1998). "Maturation-promoting factor (MPF) and mitogen activated protein kinase (MAPK) expression in relation to oocyte competence of in vitro maturation in the mare." *Mol Hum Reprod* 4: 563-70.

Goudet G, Bezard J, Duchamp G, Palmer E (1997). "Transfer of immature oocytes to a preovulatory follicle: an alternative to in vitro maturation in the mare?" *Equine Vet J* 25 (Suppl): 54-59.

Goudet G, Leclercq L, Bezard J, Duchamp G, Guillaume D, Palmer E (1998). "Chorionic gonadotropin secretion is associated with an inhibition of follicular growth and an improvement in oocyte competence for in vitro maturation in the mare." *Biol Reprod* 58: 760-68.

Griffin JL, Castleberry RS, Schneider HSJ (1981). "Influence of day of collection on recovery rate in mature cycling mares." *Theriogenology* 15: 106.

Griffin PG, Ginther OJ (1991). "Dynamics of uterine diameter and endometrial morphology during the estrous cycle and early pregnancy in mares." *Anim Reprod Sci* 25: 133-42.

Grondahl C, Hansen TH, Hossaini A, Heinze I, Greve T (1997). "Intracytoplasmic sperm injection of in vitro matured equine oocytes." *Biol Reprod* 57: 1495-501.

Grondahl C, Hyttel P, Grondahl ML, Eriksen T, Gotfredsen P, Greve T (1995). "Structural and endocrine aspects of equine oocyte maturation in vivo." *Molecular Reproduction and Development* 42: 94-105.

Guignot F, Bezard J, Palmer E (1999). "Effect of time during transport of excised mare ovaries on oocyte recovery rate and quality after in vitro maturation." *Theriogenology* 52: 757-66.

Heap RB, Hamon M, Allen WR (1982). "Study on oestrogen synthesis by the pre-implantation equine conceptus." *J Reprod Fertil* 32 (Suppl): 343-52.

Heinze H, Klug E (1975). "The use of GnRH for controlling the oestrous cycle of the mare ( Preliminary Report)." *J Reprod Fertil* 23 (Suppl): 275-77.

Hershman L, Douglas RH (1979). "The critical period for the maternal recognition of pregnancy in pony mares." *J Reprod Fertil* 27 (Suppl): 395-401.

Hinrichs K (1985). "Pregnancy in ovariectomized mares achieved by embryo transfer: A preliminary study." *Equine Vet J* 3 (Suppl): 74-75.

Hinrichs K (1990). "A simple technique that may improve the rate of embryo recovery on uterine flushing in mares." *Theriogenology* 33: 937-42.

Hinrichs K (1991). "The relationship of follicular atresia to follicular size, oocyte recovery rate on aspiration and oocyte morphology in the mare." *Theriogenology* 36.

Hinrichs K (1997). *Assisted reproductive techniques in the mare. Current Therapy in Equine Medicine*. E. Robinson and M. R. Wilson. Philadelphia, WB Saunders Company. 4: 565-71.

Hinrichs K (1998). "Production of embryos by assisted reproduction in the horse." *Theriogenology* 49: 13-21.

Hinrichs K, Betschart RW, McCue PM, Squires EL (2000). "Effect of time of follicular aspiration on pregnancy rates after oocyte transfer in the mare." *J Reprod Fertil* 56 (Suppl): 493-98.

Hinrichs K, DiGiorgio LM (1991). "Embryonic development after intrafollicular transfer of horse oocytes." *J Reprod Fertil* 44 (Suppl): 369-74.

Hinrichs K, Kenney RM (1987). "Effect of timing of progesterone administration on pregnancy rate after embryo transfer in ovariectomized mares." *J Reprod Fertil* 35 (Suppl): 439-43.

Hinrichs K, Kenney DF, R M (1990). "Aspiration of oocytes from mature and immature preovulatory follicles in the mare." *Theriogenology* 34: 107-12.

Hinrichs K, Kenney RM (1987). "A colpotomy procedure to increase oocyte recovery rates on aspiration of equine preovulatory follicles." *Theriogenology* 27: 237.

Hinrichs K, Love CC, Brinsko SP, Choi YH, Varner DD (2002). "In vitro fertilization of in vitro matured equine oocytes: effect of maturation medium, duration of maturation, and sperm calcium ionophore treatment and comparison with rates of fertilization in vivo after oviductal transfer." *Biol Reprod* 67: 256-62.

Hinrichs K, Martin M, P P (1992). "Effect of follicular components on maintenance of meiotic arrest in horse oocytes." *Theriogenology* 37: 223.

Hinrichs K, Matthews GL, Freeman DA, Torello EM (1998). "Oocyte transfer in mares." *J AVMA* 212: 982-86.

Hinrichs K, Provost PJ, Torello EM (1999). "Birth of a foal after oocyte transfer to a nonovulating, hormone-treated recipient mare." *Theriogenology* 51: 1251-58.

Hinrichs K, Provost PJ, Torello EM (2000). "Treatments resulting in pregnancy in nonovulating, hormone-treated oocyte recipient mares." *Theriogenology* 54: 1285-93.

Hinrichs K, Schmidt AL (2000). "Meiotic competence in horse oocytes: Interactions among chromatin configuration, follicle size, cumulus morphology and season." *Biol Reprod* 62: 1402-08.

Hinrichs K, Schmidt AL, Selgarth LP, Martin MG (1993). "In vitro maturation of horse oocytes- characterization of chromatin configuration using fluorescence microscopy." *Biol Reprod* 48: 363-70.

Hinrichs K, Sertich PL, Kenney RM (1986). "Use of altrenogest to prepare ovariectomized mares as embryo transfer recipients." *Theriogenology* 26 (4): 455-60.

Hinrichs K, Sertich PL, Palmer E, Kenney RM (1987). "Establishment and maintenance of pregnancy after embryo transfer in ovariectomized mares treated with progesterone." *J Reprod Fertil* 80: 395-401.

Hinrichs K, Watson ED (1988). "Clinical report: recovery of a degenerating 14-day embryo in the uterine flush of a mare seven days after ovulation." *Theriogenology* 30: 349-53.

Hinrichs K, Williams KA (1997). "Relationship among oocyte-cumulus morphology, follicular atresia and oocyte meiotic competence in the horse." *Biol Reprod* 57: 377-84.

Hochi S, Fujimoto T, Braun J, Oguri N (1994). "Pregnancies following transfer of equine embryos cryopreserved by vitrification." *Theriogenology* 42: 1085-94.

Hochi S, Fujimoto T, Choi YH, Braun J, Oguri N (1994). "Cryopreservation of equine oocytes by 2-step freezing." *Theriogenology* 42: 1085-94.

Hochi S, Fujimoto T, Oguri N (1995). "Large equine blastocysts are damaged by vitrification procedures." *Reprod Fertil Dev* 7: 113-17.

Hochi S, Kozawa M, Fujimoto T, Hondo E, Yamada J, Oguri N (1996). "In vitro maturation and transmission electron microscopic observation of horse oocytes after vitrification." *Cryobiology* 33 (3): 300-10.

Hochi S, Maruyama K, Oguri N (1996). "Direct transfer of equine blastocysts frozen-thawed in the presence of ethylene glycol and sucrose." *Theriogenology* 46: 1217-24.

Hofferer S, Duchamp G, Palmer E (1991). "Ovarian response in mares to prolonged treatment with exogenous equine pituitary gonadotropins." *J Reprod Fertil* 44 (Suppl): 341-49.

Holtan DW, Squires EL, Lapin DR, Ginther OJ (1979). "Effect of ovariectomy on pregnancy in mares." *J Reprod Fertil* 27 (Suppl): 457-63.

Hughes JP, Stabenfeldt GH, Evans JW (1972). "Clinical and endocrine aspects of the estrous cycle of the mare." *Proc Am Assoc Equine Practice* 18: 119-48.

Hughes MA, Anderson GB (1982). "Short-term storage of rabbit embryos at 4°C." *Theriogenology* 18: 275.

Huhtinen M, Koskinen E, Skidmore JA, Alien WR (1996). "Recovery rate and quality of embryos from mares inseminated after ovulation." *Theriogenology* 45: 719-26.

Huhtinen M, Sjöholm A, Paranko J (2000). Comparison of glycerol and ethylene glycol in equine embryo freezing using confocal microscopy, dapi-staining and non-surgical transfer. 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer, Saari, Finland, Havemeyer Foundation.

Hurt AE, Land IM, Alvarenga F, Seidel GE, Squires EL (2000). "Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, Ficoll and sucrose solution using open-pulled straws." *Theriogenology* 54: 119-28.

Hurt AE, Squires EL, Seidel GEJ (1999). "Vitrification of equine and bovine oocytes in ethylene glycol, Ficoll and sucrose using open pulled straws." *Theriogenology* 51: 166.

Im KS, Park KW (1995). "Effects of epidermal growth factor on maturation, fertilization and development of bovine follicular oocytes." *Theriogenology* 44: 209.

Imel KJ (1981). Recovery, culture and transfer of equine embryos. Fort Collins, Colorado State University.

Imel KJ, Squires EL, Elsdon RP, Shideler RK (1981). "Collection and transfer of equine embryos." J AVMA 179: 987-91.

Imel KJ, Squires EL, Shideler RK (1981). "A comparison of reproductive performance of fertile versus infertile donor mares." Theriogenology 15: 107.

Irvine C (1993). Prostaglandins. Philadelphia, Lea & Febiger.

Irvine CHG (1983). "The twinning connection." Equine Vet J 15 (4): 293-94.

Iuliano MF, Squires EL (1985). "Embryo transfer in two-year-old mares." Theriogenology 24 (6): 647-53.

Iuliano MF, Squires EL, Cook VM (1985). "Effect of age of equine embryos and method of transfer on pregnancy rate." J Vet Sci 60 (1): 258-63.

Jöchle W (1995). "Ovulationskontrolle bei der Stute mit Ovuplant (Kurzzeit-Freisetzung des GnRH-Analogs Deslorelinazetat)." Tierärztl Praxis 23: 381-93.

Jöchle W, Hanim D, Sieme IL, Merkt H (1991). "Clinical experiences in anestrus mares with EAZI breed CIDR-B, an intravaginal progesterone delivering device, used in the transition phase and during the season." Reproduction in Domestic Animals 26: 183.

Johnson AL (1986). "Pulsatile administration of gonadotropin releasing hormone advances ovulation in cycling mares." Biol Reprod 35: 1123-30.

Kanitz W, Torner H, Becker F, Alm H, Kurth J (1997). "Ultrasound-guided follicular aspiration in combination with in vitro oocyte maturation and fertilization in horses." Archiv für Tierzucht 40: 128-34.

Kato H, Seidel GE, Squires EL, Wilson JM (1997). "Treatment of equine oocytes with A23187 after intracytoplasmic sperm injection." *Equine Vet J* 25 (Suppl): 51-53.

Kenney RM, Condon W, Ganjam VK, Channing C (1979). "Morphological and biochemical correlates of equine ovarian follicles as a function of their state of viability of atresia." *J Reprod Fertil* 27 (Suppl): 163-71.

Kimura Y, Yanagimachi R (1995). "Intracytoplasmic sperm injection in the mouse." *Biol Reprod* 52: 709-20.

Kindahl H, Knudsen O, Madey A, Edqvist LE (1982). "Progesterone, prostaglandin 2a, PMSG and oestrone sulphate during early pregnancy in the mare." *J Reprod Fertil* 32 (Suppl): 353-59.

Klug E, Jöchle W (2001). "Advances in synchronizing estrus and ovulations in the mare : a mini review." *J Equine Vet Sci* 21 (10): 474-79.

Klug E, Meinert K, von Lepel J, Eberslöh J, Biet K, Lübbecke M, Bader H, Merkt H, Jöchle W (1992). Acceleration of ovulation in the mare with a short-acting subcutaneous implant of the GnRH analog deslorelin. 12th Int Congress on Animal Reproduction, The Hague, Netherlands.

Koene MH, Bader H, Hoppen HO (1991). "Feasibility of using HNG as a superovulatory drug in a commercial embryo transfer program." *J Reprod Fertil* 44 (Suppl): 710-11.

Kot K, Tischner M (1991). "Embryo recovery from mares exposed to year-to-year artificially prolonged daylength." *Theriogenology* 36: 357-65.

Kräusslich H (1994). *Tierzuchtungslehre*, Verlag Eugen Ulmer.

Lagneaux D, Palmer E (1989). "Are pony and larger mares similar as recipients for non-surgical transfer of Day 7 embryos?" *Equine Vet J* 8 (Suppl): 64-67.



Lagneaux D, Palmer E (1991). "Non-surgical recovery of morulae in the mare for freezing purposes using induction of ovulation." *Theriogenology* 35: 228.

Landim e Alvarenga FC, Alvarenga MA, Meira C (1993). "Transmission electron microscopy of equine embryos cryopreserved by different methods." *Equine Vet J* 15 (Suppl): 67-70.

Landim-Alvarenga FC, Rubin MIB, Silva CAM, Ponchirolli CB, Alves DF, Maclellan LJ (2002). "Effect of culture media on in vitro maturation of equine oocytes." *Theriogenology* 57: 725.

Lane M, Forest KT, Lyons EA, Bavister BD (1999). "Live births following vitrification of hamster embryos using a novel containerless technique." *Theriogenology* 51: 167.

Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK (1999). "Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop containerless technique." *Fertil and Steril* 72 (6): 1073-78.

Lapin DR, Ginther OJ (1977). "Induction of ovulation and multiple ovulations in seasonally anovulatory and ovulatory mares with an equine pituitary extract." *J Animal Sci* 44 (5): 834-42.

Lazzari G, Crotti G, Turini P, Duchi R, Mari G, Zavaglia G, Barbacini S, Galli C (2002). "Equine embryos at the compacted morula and blastocyst stage can be obtained by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of in vitro matured oocytes with frozen-thawed spermatozoa from semen of different fertilities." *Theriogenology* 58: 709-12.

Legrand E, Krawiecki JM, Tainturier D, Corniere P, Delajarraud H, Bruyas JF (2000). Does the embryonic capsule impede the freezing of equine embryos? 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer, Saari, Finland, Havemeyer Foundation.

Leibfried L, First NL (1979). "Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro." *J Anim Sci* 48: 76-86.

Leibo SP (1984). "One-step method for direct non-surgical transfer of frozen-thawed bovine embryos." *Theriogenology* 21: 767-90.

Leidl W, Braun J (1987). "Zur Embryogewinnung beim Pferd." *Zuchthygiene* 22: 64-72.

Li LY, Meintjes M, Graff KJ, al. e (1995). "In vitro fertilization and development of in vitro matured oocytes aspirated from pregnant mares." *Biol Reprod Monogr* 1: 309-17.

Li X, Allen WR (2002). "Influence of donor cell age on nuclear reprogramming and first embryonic division in horse oocytes reconstructed with the nuclei of foetal and adult cells." *Theriogenology* 58: 767-70.

Li X, Morris LH, Allen WR (2001). "Influence of co - culture during maturation on the developmental potential of equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI)." *Reproduction* 121 (6): 925-32.

Li X, Morris LH, Allen WR (2002). "In vitro development of horse oocytes reconstructed with the nuclei of fetal and adult cells." *Biol Reprod* 66 (5): 1288-92.

Li X, Morris LHA, Allen WR (2000). "Chromatin reprogramming in enucleated horse oocytes injected with cumulus cell nuclei." *J Reprod Fertil* 25: 77.

Li XH, Morris LHA, Allen WR (2000). "Effects of different activation treatments on fertilization of horse oocytes by intracytoplasmic sperm injection." *J Reprod Fertil* 119: 253-60.

Love CC, Love LB, Varner DD, Hinrichs K (2002). "Effect of holding at room temperature on initial chromatin configuration and in vitro maturation rate of equine oocytes." *Theriogenology* 57: 1973-79.

Loy R, Buell JR, Stevenson W (1979). "Sources of variation in response intervals after prostaglandin treatment in mares with functional corpora lutea." *J Reprod Fertil* 27 (Suppl): 229-35.

Loy RG, Pemstein R, O'Canna D, Douglas RH (1981). "Control of ovulation in cycling mares with ovarian steroids and prostaglandin." *Theriogenology* 15: 191-200.

Lübbecke M, Klug E, Hoppen HO, Jöchle W (1994). "Attempts to synchronize estrus and ovulation in mares using progesterone (CIDR-B) and GnRH-analog deslorelin." *Reproduction in Domestic Animals* 29: 305-14.

Maclellan LJ, Carnevale EM, Coutinho da Silva MA, Scoggin CF, Bruemmer JE, Squires EL (2002). "Pregnancies from vitrified equine oocytes collected from super-stimulated and non-stimulated mares." *Theriogenology* 58: 911-19.

Maclellan LJ, Lane M, Sims MM, Squires EL (2001). "Effect of sucrose or trehalose on vitrification of equine oocytes 12 h or 24 h after the onset of maturation." *Theriogenology* 55: 310.

Marion GB, Gier HT, Choudary JB (1968). "Micromorphology of the bovine ovarian follicular system." *J Anim Sci* 27: 451-65.

Martin JM, Squires EL, Jasko DL, Carney NJ (1991). "Effect of storage of equine embryos at 5°C for 18 and 36 hours." *Theriogenology* 35: 238.

McCue PM, Carney NJ, Hughes JP, Rivier J, Vale W, Lasley BL (1992). "Ovulation and embryo recovery rates following immunization of mares against an inhibin alpha-subunit fragment." *Theriogenology* 38: 823-31.

McCue PM, Fleury JJ, Denniston DJ, Graham JK, Squires EL (2000). "Oviductal insemination of mares." *J Equine Reprod Fertil* 56 (Suppl): 499-502.

McCue PM, Hughes JP, Lasley BL (1993). "Effect on ovulation rate of passive immunisation of mares against inhibin." *Equine Vet J* 15 (Suppl): 103-06.

McCue PM, Squires EL, Bruemmer JE, Niswender KD (2001). Equine Embryo Transfer: Techniques, Trends And Anecdotes. Annual Conference of the Society for Theriogenology in cooperation with American College of Theriogenologists, Vancouver, British Columbia, Canada.

McKinnon AO, Brown RW, Pashen RL, Greenwood PE, Vasey JR (1992). "Increased ovulation rates in mares after immunization against recombinant bovine inhibin a- subunit." Equine Vet J 24: 144-46.

McKinnon AO, Carnevale EM, Squires EL, Carney NJ, Seidel GEJ (1989). "Bisection of equine embryos." Equine Vet J 8 (Suppl): 129-33.

McKinnon AO, Carnevale EM, Squires EL, Voss JL, Seidel GE (1988). "Heterogenous and xenogenous fertilization of equine oocytes." Equine Vet Sci 8: 143-47.

McKinnon AO, Lacham-Kaplan O, Trounson AO (2000). "Pregnancies produced from fertile and infertile stallions by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of single frozen-thawed spermatozoa into in vivo matured mare oocytes." J Reprod Fertil 56 (Suppl): 513-17.

McKinnon AO, Lescun TB, Walker JH, Vasey JR, Allen WR (2000). "The inability of some synthetic progestagens to maintain pregnancy in the mare." Equine Vet J 32 (1): 83-5.

McKinnon AO, Squires EL, Carnevale EM, Hermetet MJ (1988). "Ovariectomized, steroid-treated mares as embryo transfer recipients and as a model to study the role of progestins in pregnancy maintenance." Theriogenology 29: 1055-63.

McKinnon AO, Squires EL (1986). Monitoring growth and development of the normal fetus. 4th Annu Shortcourse Equine Ultra.

McKinnon AO, Squires EL (1988). "Equine Embryo Transfer." Veterinary Clinics of North America: Equine Practice 4 (2): 305-33.

McKinnon AO, Squires EL (1988). "Morphologic assessment of the equine embryo." J AVMA 192: 401-06.

McKinnon AO, Squires EL, Voss JL (1987). "Ultrasound examination of the mare's reproductive tract. Part II: The uterus." *Comp Cont Educ* 9: 472.

McKinnon AO, Squires EL, Voss JL, Cook VM (1988). "Equine embryo transfer: A review." *Comp Cont Educ Pract Vet* 10: 343-55.

Meadows SJ, Binns MM, Newcombe JR, Thompson CJ, Rossdale PD (1995). "Identical triplets in a Thoroughbred mare." *Equine Vet J* 27 (5): 394-97.

Meinert C, Silva JFS, Kroetz I, Klug E, Trigg TE, Hoppen HO, Jöchle W (1993). "Advancing the time of ovulation in the mare with a short-term implant releasing the GnRH analogue deslorelin." *Equine Vet J* 25 (1): 65-68.

Meintjes M, Bellow MS, Broussar JR, Paccamonti D, Eilts BE, Godke RA (1994). "Repeated transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval from pregnant mares." *Theriogenology* 41: 255.

Meira C, Alvarenga MA, Papa FO, Landim E, Alvarenga FC (1993). "Cryopreservation of equine embryos using glycerol and 1,2-propanediol as cryoprotectants." *Equine Vet J* 15 (Suppl): 64-6.

Meyers PJ (1997). Control and synchronization of the estrous cycle and ovulation. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. R. S. Younquist and W. R. Threlfall. Philadelphia, Saunders: 96-102.

Michel T (1989). LH-Sekretionsdynamik im Zyklus der Stute. Tierärztliche Hochschule. Hannover.

Michel TH, Rossdale PD, Cash RSG (1986). "Efficiency of human chorionic gonadotropin and gonadotropin releasing hormone for hastening ovulation in Thoroughbred mares." *Equine Vet J* 18: 438-42.

Mizumachi M, Voglmayr JK, Washington DW, Chen CLC, Bardin CW (1990). "Superovulation of ewes immunized against the human recombinant inhibin  $\alpha$ -subunit associated with increased pre- and postovulatory follicle stimulating hormone levels." *Endocrinology* 126: 1058-63.

Moor RM, Osborn JC, Cran DG, Walter DE (1981). "Selective effects of gonadotrophins on cell coupling, nuclear maturation and protein synthesis in mammalian oocytes." *J Embryol Exp Morph* 61: 347-65.

Moor RM, Trounson AO (1977). "Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent developmental capacity." *J Reprod Fertil* 49: 101-09.

Müller Z, Cikryt P (1989). "A simple method for bisecting horse embryos." *Equine Vet J* 8 (Suppl): 123-25.

Muller Z, Cunat L (1993). "Special surgical transfers of horse embryos." *Equine Vet J* 15 (Suppl): 113-15.

Murer-Orlando M, Betteridge KJ, Richer C-L (1982). "Cytogenetic sex determination in cultured cells of pre-attachment horse embryos." *Ric Sci Educaz Permanent* 24 (Suppl): 372-78.

Neely D (1988). Progesterone/ progestin therapy in the broodmare. 34th Annual Conference of the American Association of Equine Practicioners, San Diego, CA.

Neumann H, Alm H, Schnurrbusch U, Torner H, Kanitz W (1996). "Electron microscopic study of horse oocytes matured in vitro for 10, 20 and 30 hours." *Archiv für Tierzucht* 39: 83.

Newcombe JR (1995). "The incidence of multiple ovulation and multiple pregnancy in mares." *Vet Rec* 137: 121-23.

Oberstein N, ODonovan MK, Bruemmer JE, Seidel GE, Carnevale EM, Squires EL (2001). "Cryopreservation of equine embryos by open pulled straw, cryoloop or conventional slow cooling methods." *Theriogenology* 55: 607-13.

Oguri N, Tsutsumi Y (1972). "Non-surgical recovery of equine eggs, and an attempt at non-surgical egg transfer in horses." *J Reprod Fertil* 31: 187-95.

Oguri N, Tsutsumi Y (1974). "Non-surgical egg-transfer in mares." *J Reprod Fertil* 41: 313-20.

Oguri N, Tsutsumi Y (1980). "Non-surgical transfer of equine embryos." *Arch Androl* 5: 108-10.

Okolski A, Babusik P, Tischner M, Lietz W (1987). "Evaluation of mare oocyte collection methods and stallion sperm penetration of zona-free hamster ova." *J Reprod Fertil* 35 (Suppl): 191-96.

Okolski A, Bezard J, Magistrini M, Palmer E (1991). "Maturation of oocytes from normal and atretic equine ovarian follicles as affected by steroid concentrations." *J Reprod Fertil* 44 (Suppl): 385-92.

Okolski A, Slonina D, Banasinska K (1993). "In vitro maturation of equine oocytes in co - culture with granulosa and theca interna cells." *Equine Vet J* 15 (Suppl): 84-86.

Palmer E (1985). "Recent attempts to improve synchronization of ovulation and to induce superovulation in the mare." *Equine Vet J* 3 (Suppl): 11-18.

Palmer E, Bezard J, Magistrini M, Duchamp G (1991). "In vitro fertilization in the horse. A retrospective study." *J Reprod Fertil* 44 (Suppl): 375-84.

Palmer E, Duchamp G, Bezard J, Magistrini M, King A, Bousquet D, Betteridge K (1986). "Recovery of follicular fluid and oocytes of mares by non-surgical puncture of the preovulatory follicle." *Theriogenology* 25 (1): 178.

Palmer E, Duchamp G, Bezard J, Magistrini M, King WA, Bousquet D, Betteridge KJ (1987). "Non-surgical recovery of follicular fluid and oocytes of mares." *J Reprod Fertil* 35 (Suppl): 689-90.

Palmer E, Duchamp G, Boyazoglu S, Bezard J (1997). "The follicular fluid is not a compulsory carrier of the mares oocyte at ovulation." *Equine Vet J* (Suppl).

Palmer E, Hajmeli G, Duchamp G (1993). "Gonadotrophin treatments increase ovulation rate but not embryo production from mares." *Equine Vet J* 15 (Suppl): 99-102.

Parry-Weeks LC, Holtan DW (1987). "Effect of altrenogest on pregnancy maintenance in unsynchronized equine embryo recipients." *J Reprod Fertil* 35 (Suppl): 433-38.

Pascoe DR, Liu IKM, Spensley MS, Hughes JP (1985). "Effect of endometrial pathology on the success of non-surgical embryo transfer." *Equine Vet J* 3 (Suppl): 108-10.

Pashen RL (1986). Short term storage and survival of equine embryos after refrigeration at 4°C. 4th International Symposium on Equine Reproduction, Calgary.

Peippo J, Huhtinen M, Kotilainen T (1995). "Sex diagnosis of equine preimplantation embryos using the polymerase chain reaction." *Theriogenology* 44: 619-27.

Perkins (1999). *Veterinary Clinics of North America, Equine Practice* 15 (3): 687-704.

Peyrot LM, Little TV, Lowe JE, Weber JA, Woods GL (1987). "Autotransfer of day 4 embryos from oviduct to oviduct versus to uterus in the mare." *Theriogenology* 28: 699-708.

Pfaff R, Seidel GEJ, Squires EL, Jasko DJ (1993). "Permeability of equine blastocysts to ethylene glycol and glycerol." *Theriogenology* 39: 284.

Pfaff RT (1994). Effects of cryoprotectants on viability of equine embryos. Fort Collins, Colorado State University.



Pierson RA, Ginther OJ (1987). "Follicular population dynamics during the estrous cycle of the mare." *Anim Reprod Sci* 14: 219-31.

Pierson RA, Ginther OJ (1990). "Ovarian follicular response of mares to an equine pituitary extract after suppression of follicular development." *Anim Reprod Sci* 22: 131-44.

Poitras P, Guay P, Vaillancourt D, Zidane N, BigrasPoulin M (1994). "In vitro viability of cryopreserved equine embryos following different freezing protocols." *Canadian Journal of Veterinary Research* 58: 235-41.

Rajakoski E (1960). "The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical and left - right variations." *Acta Endocrinol* 52 (Suppl): 1-68.

Reggio BC, Cochran RA, Guitreau A, Carter JA, Denniston RS, Godke RA (2000). Transvaginal follicle aspiration and electrofusion of reconstructed enucleated equine oocytes. International Symposium on Equine Embryo Transfer, Stockholm, Sweden.

Rieger D, Bruyas JF, Lagneaux D, Bezard J, Palmer E (1991). "The effect of cryopreservation on the metabolic activity of day 6.5 horse embryos." *J Reprod Fertil* 44 (Suppl): 411-17.

Riera FL, McDonough J (1993). "Commercial embryo transfer in polo ponies in Argentina." *Equine Vet J* 15 (Suppl): 116-18.

Riera FL, Roldan JE, Hinrichs K (2000). Effect of insemination timing on embryo recovery rate, pregnancy rate after transfer and pregnancy loss rate in a commercial embryo transfer programme. 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer, Saari, Finland, Havemeyer Foundation.

Romagnano A, King WA, Richer C-L, Perrone M-A (1985). "A direct technique for the preparation of chromosomes from early equine embryos." *Can J Genet Cytol* 27: 365-69.

Romagnano A, Richer C-L, King WA, Betteridge KJ (1987). "Analysis of X-chromosome inactivation in horse embryos." *J Reprod Fertil* 35 (Suppl): 353-61.

Roser JF, Kiefer BL, Evans JW, Neely DP, Pacheco CA (1979). "The development of antibodies to human chorionic gonadotrophin following its repeated injection in the cyclic mare." *J Reprod Fertil* 27 (Suppl): 173-79.

Sansinena MJ, Reggio BC, Denniston RS, Godke RA (2002). "Nuclear transfer embryos from different equine cell lines as donor karyoblasts using the bovine oocyte as recipient cytoplasm." *Theriogenology* 58: 775-77.

Savage NC, Woodcock LA, Gannes de G (1989). "Use of two-year-old mares as embryo donors in a commercial embryo transfer programme." *Equine Vet J* 8 (Suppl): 68-70.

Schiewe MC, Schmidt PM, Bush M, et al. (1985). "Toxicity potential of absorbed-retained ethylene oxide residues in culture dishes on embryo development in vitro." *J Anim Sci* 60: 1610-18.

Schneider U, Mazur P (1984). "Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos." *Theriogenology* 21: 68-79.

Scott TJ, Carnevale EM, McLellan LJ, Scoggin CF, Squires EL (2001). "Embryo development rates after transfer of oocytes matured in vivo, in vitro or within oviducts of mares." *Theriogenology* 55: 705-15.

Seidel GE (1989). "Methods and comparative aspects of embryo cryopreservation in domestic animals." *Equine Vet J* 8 (Suppl): 77-79.

Seidel GE (1996). "Cryopreservation of equine embryos." *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 12 (1): 85-101.

Seidel GEJ (1988). Principles of cryopreservation of cells. *Human Reproduction: Current Status, Future Prospect*. R. Iizuka and K. Semm. Amsterdam, Excerpta Medica: 647-50.

Seidel GEJ, Squires EL, McKinnon AO, Long PL (1989). "Cryopreservation of equine embryos in 1,2 propanediol." *Equine Vet J* 7 (Suppl): 87-88.

Sertich PL (1989). "Transcervical embryo transfer in performance mares." J AVMA 195: 940-44.

Sertich PL, Love LB, Hodgson MR, Kenney RM (1988). "24-hour cooled storage of equine embryos." Theriogenology 30: 947-52.

Seshagiri PB, Bavister BD (1989). "Glucose inhibits development of hamster 8-cell embryos in vitro." Biol Reprod 40: 599-606.

Shabpareh V, Squires EL, D L (1992). "Collection and in vitro maturation of equine oocytes from excised mare ovaries." Theriogenology 37: 296.

Shabpareh V, Squires EL, Seidel GEJ, Jasko DJ (1993). "Methods for collecting and maturing equine oocytes in vitro." Theriogenology 40: 1161-75.

Sharp DC (1980). "Factors associated with the maternal recognition of pregnancy of mares." Veterinary Clinics of North America: Large Animal Practice 2: 277-90.

Sharp DC, McDowell KJ (1985). "Critical events surrounding the maternal recognition of pregnancy in mares." Equine Vet J 3 (Suppl): 19-22.

Shideler RK, Squires EL, Voss JL, Eikenberry DJ, Pickett BW (1982). "Progestagen therapy of ovariectomized pregnant mares." J Reprod Fertil 32 (Suppl): 459-64.

Sirard MA, Parrish JJ, Ware CB, Leibfried-Rutledge ML, First NL (1988). "The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos." Biol Reprod 39: 546-52.

Sirois J, Betteridge KJ, Goff AK (1987). "PGF<sub>2a</sub> release, progesterone secretion and conceptus growth associated with successful transcervical embryo transfer and reinsertion in the mare." J Reprod Fertil 35 (Suppl): 419-27.

Sirois J, Betteridge KJ (1988). "Transcervical collection of equine conceptuses between 10-16 days after ovulation." Theriogenology 30 (6): 1139-47.

Sirois J, Kimmich TL, al. e (1992). "FSH injections early in the cycle induce double ovulations in mares." *Theriogenology* 37: 300.

Sirotkin AV (1992). "Involvement of steroid hormones in bovine oocyte maturation in vitro." *J Steroid Biochem molec Biol* 41: 855-58.

Skidmore J, Boyle MS, Cran D, Allen WR (1989). "Micromanipulation of equine embryos to produce monozygotic twins." *Equine Vet J* 8 (Suppl): 126-128.

Skidmore JA, Boyle MS, W.A. (1991). "A comparison of two different methods of freezing horse embryos." *J Reprod Fertil* 44 (Suppl): 714-16.

Slade NP, Takeda T, Elsden RP, Seidel SE (1985). "A new procedure for cryopreservation of equine embryos." *Theriogenology* 24: 45-58.

Slade NP, Takeda T, Squires EL, Elsden RP (1984). "Development and viability of frozen-thawed equine embryos." *Theriogenology* 21: 263.

Slade NP, Williams TJ, Squires EL, Seidel GEJ (1984). Production of identical twin pregnancies by microsurgical bisection of equine embryos. 10th Int Congr Anim Reprod and AI.

Snyder DA, Garcia EH, Ginther OJ, Voss JR, Seidel GEJ (1979). "Follicular and gonadotrophic changes during transition from ovulatory to anovulatory season." *J Reprod Fertil* 27 (Suppl): 95-101.

Squires EL (1996). "Maturation and fertilization of equine oocytes." *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 12 (1): 31-45.

Squires EL, Carnevale EM, McCue PM, Bruemmer JE (2003). "Embryo technologies in the horse." *Theriogenology* 59: 151-70.

Squires EL, Cook NL (1996). "Transvaginal aspiration." *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 12 (1): 13-29.

Squires EL, Cook VM, Jasko DJ, Tarr SF (1992). Pregnancy rates after collection and shipment of equine embryos (1988 - 1991). 38th Congr Am Assoc Equine Practice.

Squires EL, Cook VM, Voss JL (1985). "Collection and transfer of equine embryos." Bulletin No1, Fort Collins, Colorado State University Animal Reproduction Laboratory.

Squires EL, Dippert KD, Farlin ME, Jasko DJ (1992). "Attempt to improve embryo recovery from mares." Theriogenology 37: 302.

Squires EL, Imel KJ, Iuliano MF, Shideler RK (1982). "Factors affecting reproductive efficiency in an equine embryo transfer program." J Reprod Fertil 32 (Suppl): 409-14.

Squires EL, Iuliano MF, Shideler RK (1982). "Factors affecting the success of surgical and nonsurgical equine embryo transfer." Theriogenology 17 (1): 35-41.

Squires EL, McCue PM, Vanderwall D (1999). "The current status of equine embryo transfer." Theriogenology 51: 91-104.

Squires EL, McKinnon AO, Carnevale EM, Morris R, Nett TM (1987). "Reproductive characteristics of spontaneous single and double ovulating mares and superovulated mares." J Reprod Fertil 35 (Suppl): 399-403.

Squires EL, Pickett BW, Graham JK, Vanderwall DK, McCue PM, Bruemmer JE (1999). "Cooled and frozen stallion semen." CSU Animal Reproduction Biotechnology Laboratory, Bulletin No. 09, Fort Collins, CO.

Squires EL, Seidel GE, McKinnon AO (1989). "Transfer of cryopreserved equine embryos to progestin-treated ovariectomised mares." Equine Vet J 8 (Suppl): 89-91.

Squires EL, Seidel GEJ (1995). "Collection and transfer of equine embryos." Animal Reproduction and Biotechnology Bulletin No 11. Fort Collins CO: Colorado State University:

7-9

11-15

27-32.

Squires EL, Wilson JM, Kato H, Blaszczyk A (1996). "A pregnancy after intracytoplasmic sperm injection into equine oocytes matured in vitro." *Theriogenology* 45: 306.

Stabenfeldt GH, Hughes JP, Evans JW (1972). "Ovarian activity during the estrous cycle of the mare." *Endocrinology* 90: 1379-84.

Stabenfeldt GH, Kindahl H, Hughes JP, Neely DP, Liu I, Pascoe D (1981). "Control of luteolysis in the mare." *Acta Veterinaria Scandinavia* 77 (Suppl): 159-70.

Steffenhagen WP, Pineda MH (1972). "Retention of unfertilized ova in uterine tubes of mares." *Am J Vet Res* 33: 2391-98.

Steiner JV, Jordan MT (1988). "Ovulation rates, embryo collection rates and embryo transfer rates for mature and two-year-old Hannoverian mares." *Equine Practice* 10 (8): 6-8.

Steward F, Allen WR (1979). "The binding of FSH, LH and PMSG to equine gonadal tissues." *J Reprod Fertil* 27 (Suppl): 431-40.

Stoklosowa S, Bahr J, Gregoraszczuk E (1978). "Some morphological and functional characteristics of cells of the porcine theca interna in tissue culture." *Biol Reprod* 19: 712-19.

Takeda T, Elsdon RP, Squires EL (1984). In vitro and in vivo development of frozen-thawed equine embryos. 10th Int Congr Anim Reprod and AI, Urbana, IL.

Taverne MAM, Van der Weyden GC, Fontjine P, Dieleman SJ, Pashen RL, Allen WR (1979). "In vivo myometrial electrical activity in the cyclic mare." *J Reprod Fertil* 56: 521-32.

Tischner M (1985). "Embryo recovery from Polish pony mares and preliminary observations on foal size after transfer of embryos to large mares." *Equine Vet J* 3 (Suppl): 96-98.

Tischner M, Bielanski A (1980). "Non-surgical embryo collection in the mare and subsequent fertility of donor animals." *J Reprod Fertil* 58: 357-61.

Troedsson MH, Liu IK, Crabo BG (1998). "Sperm transport and survival in the mare: a review." *Theriogenology* 50: 807-18.

Urwin VE, Allen WR (1982). "Pituitary and chorionic gonadotrophic control of ovarian function during early pregnancy in equids." *J Reprod Fertil* 32 (Suppl): 371-81.

Urwin VE, Allen WR (1983). "Follicle stimulating hormone, luteinizing hormone and progesterone concentrations in the blood of Thoroughbred mares exhibiting single and twin ovulations." *Equine Vet J* 15: 325-29.

Vajita G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H (1998). "Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos." *Molecular Reproduction and Development* 51 (1): 53-58.

Vanderwall DK (1996). "Early embryonic development and evaluation of equine embryo viability." *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 12 (1): 61-83.

Vanderwall DK, Squires EL, Brinsko SP, McCue PM (2000). "Diagnosis and management of abnormal embryonic development characterized by formation of an embryonic vesicle without an embryo in mares." *J AVMA* 217: 58-63.

Vidament M, Arnaud G, Trillaud-Geyl C, Duchamp G, Palmer E (1992). Analogue of GnRH (buserelin) and of PGF2a do not induce ovulation in mares. 12th Int Congress on Animal Reproduction, The Hague, Netherlands.

Vogelsang MM, Kraemer DC, Bowen MJ, Potter GD (1986). "Recovery of equine follicular oocytes by surgical and nonsurgical techniques." *Theriogenology* 25 (1).

Vogelsang MM, Kraemer DC, Potter GD, Stott GG (1987). "Fine structure of the follicular oocyte of the horse." *J Reprod Fertil* 35 (Suppl): 157-67.

Vogelsang MM, Kreider JL, Bowen MJ, Potter GD, Forrest DV, Kraemer DC (1988). "Methods for collecting follicular oocytes from mares." *Theriogenology* 29 (5): 1007-19.

Vogelsang SG, Bondioli KR, Massey JM (1985). "Commercial application of equine embryo transfer." *Equine Vet J* 3 (Suppl): 89-91.

Vogelsang SG, Sorensen AM, Potter GD, Burns SJ, Kraemer DC (1979). "Fertility of donor mares following nonsurgical collection of embryos." *J Reprod Fertil* 27 (Suppl): 383-86.

Vogelsang SG, Vogelsang MM (1989). "Influence of donor parity and age on the success of commercial equine embryo transfer." *Equine Vet J* 8 (Suppl): 71-72.

Wade JM, Kelly MF, Hayden TJ, Garden I (1987). "Non-surgical recovery and transfer of equine embryos." *Theriogenology* 27 (1): 290.

Walton A, Hammond J (1938). The maternal effects on growth and conformation in Shire Horse- Shetland Pony crosses. *Proc R Soc B*.

Weber JA, Freeman DA, Vanderwall DK, Woods GL (1991). "Prostaglandin E2 secretion by oviductal transport-stage equine embryos." *Biol Reprod* 45: 540-43.

Weber JA, Freeman DA, Vanderwall DK, Woods GL (1990). "Coculture of day-2-equine embryos with oviductal or uterine tissue." *Theriogenology* 33: 334.

Weber JA, Freeman DA, Vanderwall DK, Woods SL (1991). "Prostaglandin E2 hastens oviductal transport of equine embryos." *Biol Reprod* 45: 544-46.

Weber JA, Woods GL (1993). "Influence of embryonic secretory chemicals on selective oviductal transport in mares." *Equine Vet J* 15 (Suppl): 36-38.

Willadsen SM, Pashen RL, Allen WR (1980). Micromanipulation of horse embryos. *Annual Conference of the Society for the Study of Fertility*.

Williams TJ, Elsdon RP, Seidel GEJ (1983). Bisecting bovine embryos: Methods, applications, and success rates. *Proc Ann Conf AI and Embryo Transfer in Beef Cattle*, Denver.



Williamson P, Munyua S, Martin R, Penhale WJ (1987). "Dynamics of the acute uterine response to infection, endotoxin infusion and physical manipulation of the reproductive tract in the mare." *J Reprod Fertil* 35: 317-25.

Willis P, Candle AB, Fayrer-Hosken RA (1991). "Equine oocyte in vitro maturation: Influences of sera, time and hormones." *Molecular Reproduction and Development* 30: 360-68.

Willis P, Caudle AB, R A (1991). "Effects of time and hormones on in vitro maturation of equine oocytes." *Theriogenology* 35: 294.

Wilson CG, Downie CR, Hughes JP, et al. (1990). "Effects of repeated hCG injections on reproductive efficiency in mares." *J Equine Vet Sci* 10: 301-8.

Wilson JM, Caceci T, Potter GD, Kraemer DC (1987). "Ultrastructure of cryopreserved horse embryos." *J Reprod Fertil* 35 (Suppl): 405-17.

Wilson JM, Kreider JL, Potter GD, Kraemer DC (1991). "Non-surgical recovery of degenerative ova from the uteri of mares." *Theriogenology* 36: 629-36.

Wood TC, White KL, Thompson DLJ, Garza FJ (1988). "Evaluation of the expression of a male-specific antigen on cells of equine blastocysts." *J Reprod Immunol* 14: 1-8.

Woods GL, Ginther OJ (1983). "Induction of multiple ovulations during the ovulatory season in mares." *Theriogenology* 20: 437-55.

Woods GL, Ginther OJ (1984). "Collection and transfer of multiple embryos in the mare." *Theriogenology* 21 (3): 461-69.

Woods GL, Ginther OJ (1985). "Follicular dynamics in mares treated with equine pituitary extract." *Theriogenology* 23: 297-308.

Woods GL, Hillman RB, Schlafer DH (1986). "Recovery and evaluation of embryos from normal and infertile mares." *Cornell Vet* 76: 386-94.

Woods GL, White KL, Vanderwall DK, Aston KI, Bunch TD, Campbell KD, Meerdo LN (2002). "Cloned mule pregnancies produced using nuclear transfer." *Theriogenology* 58: 779-82.

Woods J, Bergfelt DR, Ginther OJ (1990). "Effects of time of insemination relative to ovulation on pregnancy rate and embryonic-loss rate in mares." *Equine Vet J* 22 (6): 410-15.

Woodward R, Dawsett KF (1985). "Non-surgical embryo transfer in the mare." *Equine Vet J* 3 (Suppl): 99.

Wrathall JHM, McLeod BJ, Glencross RG, Beard AJ, Knight PG (1990). "Inhibin immunoneutralization by antibodies raised against synthetic peptide sequences of inhibin alpha subunit: effects on gonadotropin concentrations and ovulation rate in sheep." *J Endocrinol* 124: 167-76.

Yamamoto Y, Oguri N, Tsutsumi Y, Hachinohe Y (1982). "Experiments in the freezing and storage of equine embryos." *J Reprod Fertil* 32 (Suppl): 399-403.

Yang YB, Lu KH (1990). "The influence of bovine oocyte type on in vitro fertilization and subsequent development in vitro." *Theriogenology* 33: 355.

Young C, Squires EL, Seidel GEJ (1997). "Effects of three methods of cryopreservation on survival of large equine blastocysts." *Theriogenology* 47: 395.

Zavy MT, Mayer R, Vernon MW, Sharp DC (1979). "An investigation of the uterine luminal environment in non-pregnant and pregnant pony mares." *J Reprod Fertil* 27 (Suppl): 403-11.

Zhang JJ, Boyle MS, Allen WR, Galli C (1989). "Recent studies on in vivo fertilisation of in vitro matured horse oocytes." *Equine Vet J* 8 (Suppl): 101-104.

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. J. Braun danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und für die persönliche engagierte Betreuung und Unterstützung der Arbeit. Ein besonderer Dank gilt der jederzeit zügigen Korrektur der Kapitel.

Dem Vorstand der Klinik, Herrn Prof. Dr. R. Stolla, gilt ein besonderer Dank für die Überlassung des Arbeitsplatzes und für die Beschäftigung als wissenschaftliche Angestellte bzw. Hilfskraft während der Anfertigung der Dissertation.

Vielmals bedanken möchte ich mich auch bei Adriane Hänisch-Woehl für die fachliche Unterstützung und bei allen weiteren Mitarbeitern der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik für die nette Zusammenarbeit.

Ein großer Dank geht an meine „Mädels“ für die gemeinschaftliche Durchlebung sämtlicher Höhen und Tiefen während der Anfertigung dieser Dissertation. Für das Korrekturlesen möchte ich mich besonders bei Irene und Konstanze vielmals bedanken.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Uli bedanken, der mir jederzeit mit Rat und Zuspruch zur Seite gestanden hat.

Vielmals bedanken möchte ich mich auch bei meiner großen Familie, in der mich jeder auf individuelle Weise unterstützt hat.

Meinem Bruder Kai möchte ich besonders für die Hilfe bei sämtlichen PC-Problemen danken.

Meinen Eltern gebührt der größte Dank für Ihre stete liebevolle Unterstützung, Ihr Verständnis und Ihr Vertrauen.

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

**Name:** Nina Kölle

**Geburtsdatum:** 27.07.1975

**Geburtsort:** Heilbronn

**Eltern:** Richard Albert Kölle und  
Hannelore Kölle, geborene Michel

### **Schulbildung**

1982-1986 Gerhart-Hauptmann-Grundschule, Heilbronn

1986-1995 Theodor-Heuss-Gymnasium, Heilbronn

23.06.1995 Abitur

### **Studium**

1995-2001 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität,  
München

14.09.2001 Staatsexamen

12.11.2001 Approbation als Tierärztin

11/2001 - 4/2003 Doktorandin an der Gynäkologischen und Ambulatorischen  
Tierklinik der LMU, München

### **Berufstätigkeit**

6/2002 - 12/2002 Teilzeitstelle als wissenschaftliche Mitarbeiterin an der  
Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der LMU,  
München

1/2003 - 4/2003 Teilzeitstelle als wissenschaftliche Hilfskraft an der  
Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der LMU,  
München

10.04.2003

Nina Kölle